

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

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 23.11.2017. godine, imenovana je Komisija u sastavu

1. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. dr Zorana Jelić-Ivanović, profesor emeritus Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. dr Dimitra Kalimanovska-Oštrić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom "Određivanje nivoa genske ekspresije rezistina i receptora za rezistin i koncentracije rezistina u krvi pacijenata sa ishemijskom bolesti srca" kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Munjas Jelene, 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

IZVEŠTAJ

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 123 strane, ima 28 tabela, 36 slika i 104 literaturna 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 nivoa iRNK rezistina i njegovog receptora CAP1 (protein udružen sa adenilat ciklazom 1) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracija rezistina u krvi pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i kod zdravih ispitanika (ZI). Cilj je bio i ispitati njihovu međusobnu povezanost, povezanost sa tradicionalnim i novijim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze i povezanost sa genskom ekspresijom CD36 receptora čistača.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U istraživanje je uključeno 128 ispitanika: 95 osoba sa indikacijama za koronarnu angiografiju i 33 zdrava ispitanika. Istraživanje je dizajnirano kao opservaciona, slučaj-kontrola studija, a planirano je 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.

Kod svih pacijenata je postupkom selektivne koronarne angiografije utvrđeno prisustvo, stepen ili odsustvo značajne stenozе koronarnih arterija na osnovu maksimalnog suženja lumena krvnog suda procenjenog vizuelnom analizom, pri čemu je klinički značajnom stenozom smatrano suženje lumena više od 50% u bar jednoj glavnoj koronarnoj arteriji. Dijagnoza stabilne angine pektoris (SAP) i akutnog koronarnog sindroma (AKS) postavljena je na osnovu odgovarajućih dijagnostičkih kriterijuma.

U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa stepenom ozbiljnosti ishemijske bolesti srca (IBS) određenoj prema kliničkim manifestacijama bolesti, pacijenti sa indikacijama za selektivnu koronarnu angiografiju su podeljeni u tri grupe: na pacijente sa AKS, na pacijente sa SAP i na pacijente bez anginoznih tegoba i značajne stenozе. Takođe, iz grupe pacijenata sa indikacijama za koronarnu angiografiju, posebno je izdvojena grupa pacijenata bez AKS. U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa stepenom ozbiljnosti IBS određene prema angiografski utvrđenom kriterijumu prisustva ili odsustva značajne stenozе, ovi pacijenti su podeljeni u dve grupe: na pacijente bez značajne stenozе i na pacijente sa značajnom stenozom.

Grupa zdravih ispitanika, odabranih nakon detaljnog ispitivanja njihovog zdravstvenog stanja, merenja debljine kompleksa intime i medije obe karotidne arterije i ispitivanja porodične anamneze na postojanje kardiovaskularnih bolesti kod srodnika prvog stepena, je činila kontrolnu grupu (KG) u ovoj studiji.

Nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 receptora čistača su mereni u mononuklearnim ćelijama periferne krvi metodom kvantitativnog PCR-a, iz kojih je ukupna RNK izolovana metodom sa TRIzol™ reagensom. Koncentracije rezistina i IL-6 u plazmi su određene metodom enzimskog imunoeseja (ELISA). U svim uzorcima krvi određeni su sledeći biohemijski parametri: glukoza, ukupan holesterol (UH), LDL-holesterol (LDL-H), HDL-holesterol (HDL-H), trigliceridi (TG), albumin, ukupni proteini, urea i kreatinin enzimskim metodama na automatskom analizatoru. Koncentracije C-reaktivnog proteina

visoke osetljivosti (hsCRP-a) određene su imuno-turbidimetrijskom metodom, a koncentracije insulina hemiluminescentnim enzim-immunoesejem (ECLIA) na biohemijskom analizatoru. Nivo insulinske rezistencije je kvantifikovan merenjem glukoze i insulina natašte i računanjem HOMA IR (homeostazni model procene insulinske rezistencije) indeksa. Subklase LDL i HDL lipoproteinskih čestica su određene gradijent gel elektroforezom.

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani osnovni demografski i biohemijski parametri kod svih pacijenata sa indikacijama za koronarnu angiografiju, podeljenih na pacijente sa AKS, sa SAP i na pacijente bez anginoznih tegoba i značajne stenozе i kod kontrolne grupe. Među grupama analizirani su raspodela po polu, starosti, pušačkom statusu, indeksu telesne mase (ITM), sistolnom pritisku (SP), dijastolnom pritisku (DP), kreatininu, glukozi, insulina, HOMA IR indeksu, UH, HDL-H, LDL-H, TG, hsCRP i IL-6 u plazmi kao i zastupljenost terapije lekovima iz grupe statina, ACE inhibitora, β -blokatora i diuretika. Zatim je prikazano poređenje koncentracija rezistina u plazmi i poređenje nivoa genske ekspresije rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 molekula između navedenih grupa ispitanika. Analiziran je uticaj starosti, pola, pušačkog statusa i terapije na koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i na nivoe iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 kod pacijenata i kontrolne grupe. Primenom Spearman-ove korelacione analize analizira je međusobna povezanost ispitivanih parametara kao i njihova povezanost sa lipidnim i nelipidnim faktorima za razvoj ateroskleroze,. U cilju detaljnije analize povezanosti koncentracije rezistina kako sa nivoima iRNK ispitivanih parametara tako i sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije i homeostaze glukoze, izvršena je podela pacijenata prema tercilima koncentracija rezistina u plazmi. Izvršeno je i korigovanje vrednosti rezistina u plazmi za vrednosti kreatinina Quade-ovim testom.

Nakon toga isti demografski i biohemijski parametri, koncentracije rezistina, IL-6 u plazmi i nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 kao i uticaj starosti, pola, pušačkog statusa i terapije na ove parametre analizirani su kod pacijenata sa i bez značajne stenozе (grupa pacijenata bez AKS), i kod kontrolne grupe. Primenom Pearson-ove korelacione analize analizira je međusobna povezanost određivanih parametara kao i njihova povezanost sa lipidnim i nelipidnim faktorima za razvoj ateroskleroze. Takođe, analizom kovarijanse izvršeno je i korigovanje vrednosti rezistina u plazmi, nivoa iRNK CAP1 i CD36 kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i zdravih ispitanika za odgovarajuće pridružene faktore, tj. kovarijante.

U cilju ispitivanja povezanosti novih lipidnih faktora rizika za razvoj ateroskleroze sa ispitivanim parametrima, pacijenti bez AKS su podeljeni u dve grupe prema procentualnoj

zastupljenosti malih gustih LDL čestica, a koncentracije rezistina, IL-6 u plazmi i nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 analizirani u skladu sa tim.

Primenom višestruke linearne regresione analize određen je doprinos nezavisnih prediktora koncentracijama rezistina u krvi, nivoima iRNK rezistina, CAP1 i CD36.

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

B. Opis dobijenih rezultata

Pacijenti sa indikacijama za koronarnu angiografiju i kontrolna grupa bili su usklađeni po polu dok je prosečna starost pacijenata bila veća u odnosu na zdrave ispitanike. Kada su u pitanju parametri lipidnog statusa, pacijenti sa AKS i SAP su imali značajno više vrednosti TG i niže vrednosti HDL-H u odnosu na kontrolnu grupu. Pacijenti sa AKS su imali značajno više vrednosti hsCRP-a i HOMA-IR u odnosu na kontrolnu grupu. Nivoi genske ekspresije IL-6 se nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa. Kod svih zdravih ispitanika koncentracije IL-6 su bile ispod limita detekcije testa. Koncentracije rezistina u plazmi su bile značajno više u grupi sa AKS u odnosu na KG i grupu bez anginoznih tegoba i značajne stenozе. Normalizovani nivoi iRNK rezistina se nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa. Normalizovani nivoi iRNK CAP1 i CD36 su bili značajno veći kod sve tri grupe pacijenata u odnosu na KG. Koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 nisu pokazali značajne razlike između različitih starosnih grupa, kao i između muškaraca i žena i između pušača i nepušača. Izuzetak su nivoi iRNK CD36 koji su bili značajno veći kod pušača u odnosu na nepušače u KG, dok kod pacijenata ta razlika nije uočena.

U grupi pacijenata, koncentracije rezistina su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama kreatinina i sa nivoima iRNK rezistina. Nakon korigovanja za vrednosti kreatinina, koncentracije rezistina su bile više kod svih grupa pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima i kod pacijenata sa AKS u odnosu na pacijente sa SAP i na pacijente bez anginoznih tegoba i značajne stenozе. Nakon selekcije samo pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, uočena je značajna pozitivna korelacija između rezistina u plazmi i hsCRP-a. Nivoi iRNK rezistina su značajno pozitivno korelirali sa koncentracijama rezistina i IL-6 u plazmi. Nivoi iRNK CAP1 su pokazali pozitivnu korelaciju sa koncentracijama TG i sa nivoima iRNK CD36, a negativnu sa godinama starosti ispitanika. Nivoi iRNK CD36 su pozitivno korelirali sa vrednostima ITM i nivoima iRNK rezistina i CAP1. Pacijenti su

podeljeni u tri grupe prema tercilima koncentracija rezistina u plazmi, čiji su rasponi i granice utvrđeni na osnovu distribucije koncentracija rezistina u celoj populaciji pacijenata. Uočeno je da je najveća učestalost pacijenata sa AKS bila u III tercilu, dok je najveća učestalost pacijenata bez anginoznih tegoba i bez značajne stenozе uočena u I i II tercilu.

Pacijenti sa i bez značajne stenozе koronarnih arterija imali su značajno više koncentracije glukoze, hsCRP-a i niže vrednosti HDL-H u odnosu na kontrolnu grupu. Pacijenti sa značajnom stenozom imali su više vrednosti ITM, glukoze, TG, insulina i HOMA IR u odnosu na pacijente bez značajne stenozе i u odnosu na zdrave osobe. Grupe pacijenata sa i bez značajne stenozе koronarnih arterija su imale više koncentracije rezistina u plazmi u odnosu na KG. Normalizovani nivoi iRNK rezistina i IL-6 se nisu značajno razlikovali između grupa. Normalizovane vrednosti iRNK i CAP1 i CD36 su bile ne samo značajno više kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG, već su bile značajno više i kod pacijenata sa značajnom stenozom u odnosu na one bez značajne stenozе. Nakon korekcije koncentracija rezistina za godine starosti ispitanika, ITM, kreatinin i UH, uočene razlike između ispitivanih grupa su bile veće. Takođe, nakon korekcije normalizovanih nivoa iRNK CAP1 za godine starosti ispitanika, ITM, glukozu, TG i HOMA IR indeks, razlike između obe grupe pacijenata i KG su ostale značajne, dok se uočena značajna razlika između pacijenata sa značajnom stenozom i bez značajne stenozе izgubila. Nakon korekcije normalizovanih nivoa iRNK CD36 za godine, ITM, HDL-H i hsCRP i za vrednost kreatinina razlika između pacijenata sa i bez značajne stenozе je bila na granici statističke značajnosti.

Utvrđeno je da su pacijenti sa sadržajem malih gustih LDL čestica <50% imali značajno niže vrednosti kreatinina i glukoze u odnosu na ispitanike sa sadržajem malih gustih LDL čestica \geq 50%. Takođe pacijenti sa većim sadržajem malih gustih LDL čestica (\geq 50%) su imali značajno više koncentracije rezistina i plazmi kao i značajno više nivoe iRNK rezistina u odnosu na pacijente sa manjim procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica (<50%). Utvrđeno je da su normalizovani nivoi iRNK rezistina negativno korelirali sa dijametrom LDL čestica i pozitivno sa procentualnim sadržajem malih gustih LDL čestica.

Višestrukom linearnom regresionom analizom utvrđeno je da 30% varijacije u koncentracijama rezistina u krvi kod pacijenata potiče od varijacija u koncentracijama kreatinina i UH u krvi. Nezavisni prediktori nivoa iRNK rezistina su bili dijametar LDL čestica i nivoi iRNK CD36, pri čemu 19% varijacije u nivou iRNK rezistina potiče od varijacija u dijametru LDL čestica i nivoima CD36 molekula. Kao značajni nezavisni prediktori nivoa iRNK CAP1 su se pokazali nivoi iRNK CD36 kao i koncentracija TG, koji

doprinosu varijaciji od 35% u nivoima iRNK CAP1. Takođe, kao nezavisni prediktori nivoa iRNK CD36 izdvojeni su hsCRP, kreatinin i nivoi iRNK CAP1, doprinoseći varijaciji od 50% u nivoima iRNK CD36.

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

In vitro studije su nedvosmisleno pokazale da rezistin može doprineti svim fazama razvoja aterosklerotskog plaka, od endotelne disfunkcije do destabilizacije plaka (1-11). U prilog tome govore i rezultati ove studije, koji su pokazali da je rezistin u krvi povišen kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na ulogu koju ovaj protein ima u razvoju IBS. Iako su kliničke studije pokazale kontradiktorne rezultate vezane za ulogu rezistina u IBS (6, 12-14), najnovijom meta-analizom je utvrđeno da povišene koncentracije rezistina u krvi predstavljaju povišen rizik za kardiovaskularnu smrtnost (15).

Takođe, koncentracije rezistina kod pacijenata sa AKS su bile više u odnosu na pacijente sa SAP i u odnosu na pacijente bez anginoznih tegoba i bez značajne stenozе. Studije koje su se bavile ispitivanjem povezanosti rezistina sa kliničkim manifestacijama IBS su pokazale da pacijenti sa AKS imaju povišene koncentracije rezistina u plazmi i ukazali na njegovu potencijalnu dijagnostičku vrednost (16-18). Ipak, i pored povišenih nivoa rezistina u plazmi kod pacijenata, nivoi iRNK rezistina u ovoj studiji se nisu razlikovali između ispitivanih grupa, iako je između ova dva parametra uočena pozitivna korelacija u svim grupama ispitanika, što je u skladu i sa drugim studijama (19, 20). Pokazano je da se rezistin lokalno sintetiše i sekretuje iz makrofaga koje infiltriraju aterosklerotske plakove u velikoj količini, gde svoje proinflatorne i proaterogene efekte ostvaruje autokrinim i parakrinim putem (11), a smatra se da je upravo aktivacija inflamatornih ćelija u kritičnom aterosklerotskom plaku uzrok koronarne nestabilnosti kod svih pacijenata sa AKS (21). Rezistin može doprineti aterotrombozi stimulacijom ekspresije tkivnog faktora, na taj način predstavljajući efektorski molekul koji indukuje protrombogeni fenotip u ćelijama zida krvnog suda (6). Na ovakav način, rezistin bi mogao da doprinese kompleksnim intravaskularnim inflamatornim i protrombogenim odgovorima koji su glavne komponente koje doprinose dinamičkoj nestabilnosti aterosklerotskog plaka i predstavljaju osnovu za razvoj AKS. To bi moglo da objasni zašto je, i pored nepromenjenih nivoa iRNK rezistina, njegova koncentracija bila povišena kod pacijenata sa AKS: tokom destabilizacije plaka, koja se dešava u AKS, rezistin bi dodatno mogao da se oslobodi i iz samog plaka (6, 11). Shodno tome, povećanje rezistina u plazmi pre može biti u vezi sa dinamičkom nestabilnošću

aterosklerotskog plaka, tj. sa kliničkim manifestacijama ishemijske bolesti srca, nego samo sa morfološkim prisustvom ili odsustvom značajne stenoze (5, 16-22). U tom slučaju je i očekivano da između podgrupa pacijenata bez AKS ne postoji značajna razlika u koncentracijama rezistina u plazmi, kao što je i pokazano u ovoj studiji.

Genska ekspresija receptora za rezistin, CAP1, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi je bila značajno viša kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Uloga CAP1 proteina nikada nije ispitivana kod pacijenata sa IBS, niti je CAP1 posmatran u kontekstu receptora za rezistin, ali je u onkološkim kliničkim studijama utvrđeno da je u mnogim tipovima tumorskih ćelija genska ekspresija CAP1 povišena (23-25). Uzimajući u obzir da je jedna od fundamentalnih funkcija CAP proteina ćelijska pokretljivost, prekomerna ekspresija CAP1 može imati ulogu u invaziji i metastazi tumorskih ćelija, što je udruženo sa lošijim kliničkim ishodom pacijenata (24-26). Sa druge strane, Walker i saradnici su pokazali da rezistin ispoljava hemoatraktivna svojstva prema CD4+ limfocitima, koji iako malobrojniji, predstavljaju glavne ćelije koje utiču na funkciju brojnijih makrofaga u aterosklerotskim plakovima. Pošto se rezistin u velikim količinama sintetiše i sekretuje u ateromima, neki autori smatraju da bi on mogao delovati kao medijator migracije ćelija u aterosklerotske lezije, što predstavlja jedan od glavnih koraka u razvoju ateroskleroze (10). Cho i saradnici su takođe pokazali da rezistin poseduje hemoatraktivna svojstva prema monocitima, čime se povećava ne samo veličina plaka stimulacijom infiltracije monocita, već i njegova destabilizacija (5). Utvrđeno je da upravo vezivanje rezistina za centralni domen bogat prolinom CAP1 aktivira domen receptora koji vezuje aktin, što omogućava migraciju monocita zavisnu od rezistina (27). Rezistin u povišenim koncentracijama može ostvariti snažnije efekte na mononuklearne ćelije periferne krvi sa prekomernom ekspresijom CAP1 kod pacijenata sa IBS, što bi doprinelo povećanoj invaziji mononuklearnih ćelija periferne krvi u aterosklerotske lezije. Korigovanje vrednosti genske ekspresije CAP1 za odgovarajuće kovarijante nije se odrazilo na razliku između pacijenata i zdravih ispitanika. Ovi podaci ukazuju na to da je prekomerna ekspresija CAP1 udružena sa početnim fazama razvoja bolesti koje karakteriše povećanja migracija mononuklearnih ćelija u aterosklerotske lezije (5, 10, 27), što je u skladu i sa predloženim mehanizmom dejstva CAP1 proteina (27). Uzimajući to u obzir, genska ekspresija CAP1 bi se mogla koristiti kao marker za procenu prisustva bolesti u ranim fazama.

U ovom istraživanju utvrđeno je da su nivoi iRNK CD36 viši kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, nivoi CD36 su bili viši kod pacijenata sa

značajnom stenozom u odnosu na pacijente bez značajne stenozе. Smatra se da je CD36 receptor čistač odgovoran za više od 50% unosa modifikovanih lipida endocitozom u makrofagama (26, 28), što sugeriše da pacijenti sa prekomernom genskom ekspresijom CD36 receptora čistača imaju povećan rizik za razvoj ateroskleroze, što je u skladu sa drugim studijama (29, 30).

Ova studija je pokazala da je jedan od nezavisnih prediktora nivoa iRNK CD36 kod pacijenata bez AKS marker inflamacije niskog stepena, hsCRP, tj. da je ekspresija CD36 receptora čistača pod uticajem pro-inflamatornih medijatora (31). Nivoi iRNK CD36 su snažno korelirali sa genskom ekspresijom CAP1 i u celokupnoj grupi pacijenata i u kontrolnoj grupi, pri čemu je nivo iRNK CAP1 jedan od nezavisnih prediktora nivoa genske ekspresije CD36 kod pacijenata bez AKS. Ovi podaci sugerišu da rezistin može snažnije delovati na ćelije koje imaju prekomernu ekspresiju CAP1 i doprineti povećanoj genskoj ekspresiji CD36 receptora čistača i progresiji ateroskleroze (6, 7).

Vrednosti rezistina kod pacijenata sa većim procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica su bile više u odnosu na pacijente sa sadržajem malih, gustih LDL čestica <50%, što je u skladu sa drugim studijama (12, 32). Smatra se da male, guste LDL čestice imaju najveći aterogeni potencijal i da značajno doprinose razvoju kardiovaskularnih bolesti (33-35). Pokazano je da i rekombinantni rezistin i rezistin iz humanog seruma stimulišu produkciju većeg broja lipoproteinskih čestica veoma male gustine u humanim hepatocitima i dovode do nishodne regulacije LDL-receptora u ovim ćelijama (36, 37). Na ovaj način rezistin može dovesti do smanjenog uklanjanja LDL čestica iz cirkulacije, odnosno do povećanja i njihovog poluživota i broja u cirkulaciji. U ovoj studiji je prvi put pokazano da je genska ekspresija rezistina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi viša kod pacijenata sa sadržajem malih, gustih LDL čestica $\geq 50\%$. Pored toga, pokazano je da su nezavisni prediktori nivoa iRNK rezistina kod pacijenata bez AKS bili nivoi iRNK CD36 receptora čistača i dijametar LDL čestica, dok su nezavisni prediktori nivoa iRNK receptora za rezistin bili takođe nivoi iRNK CD36 i koncentracija TG u krvi, koji umnogome doprinose formiranju malih, gustih LDL čestica (35, 38). Pozitivna asocijacija između nivoa iRNK CAP1 i nivoa iRNK CD36 i koncentracija TG je uočena i u grupi svih pacijenata sa IBS. Zid arterija je posebno permeabilan za male, guste LDL čestice, pri čemu se one i duže zadržavaju u subendotelnom prostoru i postaju podložne hemijskim modifikacijama, na prvom mestu oksidaciji (35, 38). OxLDL značajno utiče na transkripciju brojih gena monocitima i makrofagama (26). Pokazano je da oxLDL dovodi do prekomerne ekspresije gena za rezistin

u makrofagama poreklom iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, međutim mehanizmi kojima se to dešava nisu još uvek utvrđeni (8). Ovi podaci ukazuju na činjenicu da ne samo da je moguće da cirkulišući rezistin doprinosi stvaranju proaterogenijeg lipidnog profila, već da modifikovani lipidi mogu dovesti do ushodne regulacije gena za rezistin i doprineti daljem razvoju inflamacije.

Takođe ova studija je pokazala da su nivoi genske ekspresije rezistina udruženi sa markerom inflamacije IL-6, dok su koncentracije rezistina u pozitivnoj asocijaciji sa markerom inflamacije, hsCRP-om, što je u skladu sa drugim studijama (12, 14, 16, 36, 39, 40).

D. Zaključak- obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

IBS predstavlja i dalje jedan od glavnih uzroka smrtnosti u razvijenim zemljama. U velikom broju slučajeva stepen i morfološko prisustvo stenoza koje ometaju protok kroz krvne sudove ne predviđaju dovoljno dobro ishod bolesti, odnosno njene kliničke komplikacije, jer najveća opasnost aterosklerotskog plaka potiče od njegove dinamičke nestabilnosti, određene proinflamatornim procesima koji se dešavaju unutar samog plaka (21). Iz tog razloga je od presudnog značaja ispitivanje molekularnih i ćelijskih mehanizama koji doprinose razvoju inflamacije u aterosklerozi, sa aspekta dijagnostičke, prognostičke i terapijske vrednosti.

Iako otkriven pre skoro 2 decenije, funkcija koju rezistin ima u humanom organizmu nije još uvek do kraja rasvetljena, što zbog nemogućnosti translacije podataka o ovom proteinu sa miševa i pacova na humani organizam, što zbog relativno kasnog otkrivanja receptora za humani rezistin (27). Interesovanje naučne javnosti za ulogu koju ovaj protein može imati u razvoju ateroskleroze upravo je proisteklo iz njegove sposobnosti da stimuliše proinflamatorne procese, koji predstavljaju osnovu za razvoj ove bolesti (1-11, 21). Iako je njegov doprinos aterosklerozi potvrđen brojnim *in vitro* i *in vivo* eksperimentima (1-11), kliničke studije koje su izvedene do sada su nailazile na različite zaključke vezane za ulogu ovog proteina u IBS i njegovoj upotrebi kao dijagnostičkog i prognostičkog biomarkera (6, 12-18).

U ovom istraživanju prvi put je opisana genska ekspresija CAP1 i rezistina iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, zajedno sa rezistinom u plazmi kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika. Takođe, u ovom istraživanju prvi put je opisana

povezanost genske ekspresije CAP1 i rezistina iz mononuklearnih ćelija periferne krvi i genske ekspresije CD36 receptora čistača, kao i njihova povezanost sa tradicionalnim i sa novijim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika.

Rezultati ove studije ukazuju na postojanje značajne veze između rezistina i IBS, pogotovo sa kliničkim manifestacijama ove bolesti. Ispitivanjem genske ekspresije rezistina, receptora za rezistin i CD36 molekula, omogućeno je sveobuhvatnije sagledavanje uloge ovog proteina u IBS. Paralelno posmatrajući rezistin i njegov receptor, možemo zaključiti da dejstvo rezistina putem CAP1 na mononuklearne ćelije periferne krvi može imati značajnu ulogu u ranijim fazama razvoja ateroskleroze, koja je vezana za migraciju ćelija unutar aterosklerotskog plaka (21, 27), pri čemu bi se genska ekspresija CAP1 mogla koristiti kao biomarker za procenu prisustva bolesti još u ranim fazama. Međutim, obzirom na značajan porast koncentracija rezistina u AKS, ne može se isključiti doprinos rezistina kasnijim fazama razvoja bolesti putem svojih snažnih proinflamatornih dejstava koje može ostvariti na ćelije u aterosklerotskom plaku autokrinim i parakrinim putem (6, 11, 21).

Povišene vrednosti rezistina u krvi su udružene sa proaterogenijim lipidnim statusom kod pacijenata, koji se ogleda i kroz niže vrednosti HDL-H i kroz veću zastupljenost malih gustih LDL čestica. Takođe, lošiji lipidni status može uticati na ekspresiju ovog proinflamatornog molekula, obzirom da je pokazano da lipidi (dijametar LDL čestica i TG) kao i CD36 receptor pokazuju nezavisni uticaj na nivo iRNK rezistina i CAP1 receptora u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Nivoi genske ekspresije rezistina udruženi su sa markerom inflamacije IL-6, dok su koncentracije rezistina u pozitivnoj asocijaciji sa markerom inflamacije, hsCRP-om.

Nivoi iRNK CD36 receptora čistača su pod uticajem proinflamatornih faktora krvi, povezani su i sa funkcijom bubrega, ali značajan uticaj na njih ima i CAP1, tj. receptor za rezistin. Ovi prediktori doprinose varijaciji od čak 50% u nivoima iRNK CD36. Od toga, naj snažniji uticaj ima upravo CAP1, što znači da rezistin može ostvariti svoje efekte snažnije na ćelije sa prekomernom ekspresijom CAP1 i dovesti do ushodne regulacije iRNK CD36 (6, 7), na taj način doprinoseći daljem razvoju ateroskleroze.

Literatura:

1. Jamaluddin S, Yan s, Lu J, Liang Z, Yao Q, Chen C. Resistin Increases Monolayer Permeability of Human Coronary Artery Endothelial Cells. *PLoS One* 2013;8(12):e84576.
2. Chen C, Jiang J, Lu JM, Chai H, Wang X, Lin PH et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299: H193–H201.
3. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine–endothelial interaction. *Circulation* 2003;108:736–40.
4. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine– endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:415–9.
5. Cho Y, Lee SE, Lee HC, Hur J, Lee S, Youn SW, et al. Adipokine resistin is a key player to modulate monocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells, leading to progression of atherosclerosis in rabbit carotid artery. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:99–109.
6. Jamaluddin S, Weakley SM, Qizhi Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2012;165:622–32.
7. Rae C, Graham A. Human resistin promotes macrophage lipid accumulation. *Diabetologia* 2006;49:1112–4.
8. Xu W, Yu L, Zhou W, Luo M. Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:376–82.
9. Lee TS, Lin CY, Tsai JY, Wu YL, Su KH, Lu KY et al. Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life Sci* 2009;84:97–104.
10. Walcher D, Hess K, Berger R, Aleksic M, Heinz P, Bach H, et al. Resistin: a newly identified chemokine for human CD4-positive lymphocytes. *Cardiovasc Res* 2010;85:167–74.
11. Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, et al. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006;69:76–85.
12. Abate N, Sallam HS, Rizzo M, Nikolic D, Obradovic M, Bjelogrljic P, Isenovic ER. Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des* 2014;20:4961–9.
13. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E, Durrani S, Dullum MK, et al. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2005;182:241–8.
14. Pilz S, Weihrauch G, Seelhorst U, Wellnitz B, Winkelmann BR, Boehm BO, et al. Implications of resistin plasma levels in subjects undergoing coronary angiography. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:380–6.

15. Fontana A, Spadaro S, Copetti M, Spoto B, Salvemini L, Pizzini P, et al. Association between resistin levels and all-cause and cardiovascular mortality: a new study and a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10(3):e0120419.
16. Hu WL, Qiao SB, Hou Q, Yuan JS. Plasma resistin is increased in patients with unstable angina. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:871-5.
17. Qiao XZ, Yang YM, Xu ZR, Yang LA. Relationship between resistin level in serum and acute coronary syndrome or stable angina pectoris. *J Zhejiang UnivSci B* 2007;8:875–80.
18. Lubos E, Messow CM, Schnabel R, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Bickel C, et al. Resistin, acute coronary syndrome and prognosis results from the Athero Gene study. *Atherosclerosis* 2007;193:121–8.
19. Tsiotra PC, Tsigos C, Anastasiou E, Yfanti E, Boutati E, Souvatzoglou E, et al. Peripheral mononuclear cell resistin mRNA expression is increased in type 2 diabetic women. *Mediators Inflamm* 2008;2008:892864.
20. Menzaghi C, Bacci S, Salvemini L, Mendonca C, Palladino G, Fontana A, et al. Serum resistin, cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *PLoS ONE* 2013;8:e64729.
21. Crea F, Liuzzo G. Pathogenesis of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1-11.
22. Chu S, Ding W, Li K, Pang Y, Tang C. Plasma resistin associated with myocardium injury in patients with acute coronary syndrome. *Circ J* 2008;72:1249-53.
23. Hua M, Yan S, Deng Y, Xi Q, Liu R, Yang S, et al. CAP1 is overexpressed in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation. *Int J Mol Med* 2015;35:941-9.
24. Yamazaki K, Takamura M, Masugi Y, Mori T, Du W, Hibi T, et al. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Lab Invest* 2009;89:425-32.
25. Liu Y, Cui X, Hu B, Lu C, Huang X, Cai J, et al. Up-regulated expression of CAP1 is associated with tumor migration and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 2014;210:169-75.
26. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2007;75:468-77.
27. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab* 2014;19:484–97.
28. Young Mi Park. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* 2014;46(6):e99.
29. D Teupser, MA Mueller, J Koglin, W Wilfert, J Ernst, W Von Scheidt, et al. CD36 mRNA expression is increased in CD14+ monocytes of patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:552-6.
30. Maiwald S, Zwetsloot PP, Sivapalaratnam S, Dallinga-Thie GM. Monocyte gene expression and coronary artery disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:411-7.

31. Sun Y, Scavini M, Orlando RA, Murata GH, Servilla KS, Tzamaloukas AH, et al. Increased CD36 expression signals monocyte activation among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:2065-7.
32. Philipp A, Gerber PA, Thalhammer C, Schmied C, Spring S, Amann-Vesti B, et al. Small, dense LDL particles predict changes in intima media thickness and insulin resistance in men with type 2 diabetes and prediabetes – a prospective cohort study. *PLoS One* 2013;8:e72763.
33. Vekic J, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Memon L, et al. Small, dense LDL cholesterol and apolipoprotein B: relationship with serum lipids and LDL size. *Atherosclerosis* 2009;207:496-501.
34. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Peco-Antic A, Kostic M, et al. Characteristics of low-density and high-density lipoprotein subclasses in pediatric renal transplant recipients. *Transpl Int* 2011;24:1094-102.
35. Toft-Petersen AP, Tilsted HH, Aarøe J, Rasmussen K, Christensen T, Griffin BA, et al. Small dense LDL particles - a predictor of coronary artery disease evaluated by invasive and CT-based techniques: a case-control study. *Lipids Health Dis* 2011;25:10-21.
36. Costandi J, Melone M, Zhao A, Rashid S. Human resistin stimulates hepatic overproduction of atherogenic apoB-containing lipoprotein particles by enhancing apoB stability and impairing intracellular insulin signaling. *Circ Res* 2011;108:727-42.
37. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1697-705.
38. Packard CJ. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1066-9.
39. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:286–90.
40. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005;111:932-9.

E. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Jelena Joksić**, Miron Sopić, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Dimitra Kalimanovska-Oštrić, Kristina Anđelković, Zorana Jelić-Ivanović. Circulating resistin protein and mRNA concentrations and clinical severity of coronary artery disease. *Biochemia Medica* 2015;25:242-51. (IF 3,051; rang časopisa M21 (4/30) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
2. **Jelena Joksić**, Miron Sopić, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Tamara Gojković, Aleksandra Zeljković, Jelena Vekić, Kristina Anđelković, Dimitra Kalimanovska-Oštrić, Zorana Jelić-Ivanović. Higher circulating resistin protein and PBMCs resistin mRNA levels are associated with increased prevalence of small dense LDL particles in coronary artery disease patients. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2016;43:22-8. (IF 2,049; rang časopisa M22 (48/83) u kategoriji Physiology)
3. **Jelena Munjas**, Miron Sopić, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Dimitra Kalimanovska-Oštrić, Kristina Anđelković, Zorana Jelić-Ivanović. Association of adenylate cyclase-associated protein 1 with coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation* 2017;47:659-66. (IF 2,714; rang časopisa M21 (34/155) u kategoriji Medicine, General and Internal)

F. Mišljenje i predlog

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Istraživanje genske ekspresije rezistina i njegovog receptora CAP1 kod pacijenata sa ishemijskom bolešću srca predstavlja prvo kliničko ispitivanje ovih biomarkera, koje doprinosi boljem razumevanju uloge rezistina u razvoju ove bolesti. Rezultati ove doktorske disertacije imaju značaj u primeni ovih biomarkera u laboratorijskoj dijagnostici ishemijske bolesti srca. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u tri rada u međunarodnim časopisima kategorije M21 (dva rada) 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 "**Određivanje nivoa genske ekspresije rezistina i receptora za rezistin i koncentracije rezistina u krvi pacijenata sa ishemijskom bolesti srca**", kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Munjas Jelene.

Beograd 22.12.2017.

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

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

dr Dimitra Kalimanovska-Oštrić
redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
