

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.05.2019. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom “Značaj određivanja mijeloperoksidaze i raspodele subfrakcija lipoproteinskih čestica niske i visoke gustine kod dece i adolescenata sa hroničnim bolestima bubrega” kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Danijele Kornic, u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Stefanović (mentor), vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Prof. dr Aleksandra Zeljković (mentor), vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Prof. dr Zorana Jelić-Ivanović, profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
5. Doc. dr Dušan Paripović, docent, Univerzitet u Beogradu –Medicinski fakultet

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 163 strane, sadrži 39 tabela, 27 slika i 181 literaturni navod. 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 oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pedijatrijskih pacijenata u različitim stadijumima hroničnih bolesti bubrega (HBB), kao i ispitivanje povezanosti ovih parametara sa drugim određivanim lipidnim i nelipidnim parametrima. Poseban akcenat u ovoj studiji stavljen je na ispitivanje

koncentracije enzima mijeloperoksidaze (MPO) i aktivnost enzima paraoksonaze 1 (PON1) kod pacijenata u različitim stadijumima HBB, kao i na povezanost ovih enzima sa ostalim ispitivanim lipidnim i nelipidnim parametrima. Osim toga, cilj je bio da se ispita raspodela subfrakcija lipoproteinskih čestica niske gustine (LDL) i visoke gustine (HDL), kao i povezanost karakteristika raspodele LDL i HDL subfrakcija sa drugim određivanim lipidnim parametrima, te sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

U poglavlju **Materijali i metode** predstavljeni su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U istraživanju je učestvovao 51 pedijatrijski pacijent uzrasta od 3 do 21 godine: 10 pacijenata u predijaliznom stadijumu HBB, 20 pacijenata na hemodijaliznom tretmanu i 21 pacijent sa transplantiranim bubregom. Svi pacijenti su lečeni u Univerzitetskoj dečijoj klinici Tiršova na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije. Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije bili su prisustvo dijabetes melitusa (DM), pridružene manifestne kardiovaskularne bolesti ili prisustvo bilo kog drugog akutnog patofiziološkog stanja. Kontrolnu grupu su činila zdrava deca i adolescenti uzrasta 6,4 do 15 godina, koji su selektovani u toku redovnih sistematskih pregleda u Domovima zdravlja Pančevo i Kovačica. Kontrolnu grupu je činilo 50 dece, a za učešće u studiji su odabrana deca koja nisu bila uključena na bilo kakvu hroničnu ili akutnu terapiju i kod kojih na sistematskom pregledu nisu konstatovani znaci infekcije, ili prisustvo kardiovaskularnih, bubrežnih, hepatičnih ili malignih bolesti.

Istraživanje je 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.

Opšti klinički i anamnestički podaci o pacijentima uzeti su u okviru redovnih pregleda na Klinici za nefrologiju. Za procenu ranih aterosklerotskih promena pacijentima je određena debljina intime-medije karotidnih arterija (cIMT) metodom ultrasonografije.

Ukupni holesterol (UH) i trigliceridi (TG) su određeni rutinskim enzimskim metodama na ILAB 300+ biohemijском analizatoru (Instrumentation laboratory, Milano, Italija). Koncentracija HDL-holesterola (HDL-h) je određena metodom precipitacije lipoproteina koji sadrže apolipoprotein apoB-100 (apoB) u plazmi sa fosfovolframovom kiselinom u prisustvu jona magnezijuma. Vrednosti LDL-holesterola (LDL-h) su izračunate pomoću Friedewald-ove formule. Apolipoprotein A-I (apoA-I) i apoB određivani su imunoturbidimetrijskom metodom. Koncentracije uree, kreatinina i ukupnih proteina su određivane rutinskim laboratorijskim metodama na biohemijском analizatoru uz upotrebu komercijalnih testova.

Koncentracije adiponektina i leptina u plazmi su merene enzimskom imunosej (ELISA) metodom. Koncentracija lipoproteina (a) (Lp (a)) je određena pomoću specifičnih anti Lp(a) antitela imunoturbidimetrijskom metodom. Kada su u pitanju parametri oksidativnog stresa, određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS) izvršeno je primenom molarnog apsorpcionog koeficijenta, superoksidni anjon je određen redukcijom *nitrobluetetrazolium* soli spektrofotometrijski, dok su produkti oksidativne modifikacije proteina (AOPP) određivani takođe spektrofotometrijski.

Među parametrima antioksidativne zaštite određivana je aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) modifikacijom originalne metode koja se zasniva na sposobnosti enzima SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini. Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa (SH grupe) određen je spektrofotometrijski. Status enzima PON1 određen je kao aktivnost enzima prema dva različita supstrata: paraoksonu (POazna aktivnost) i diazoksonu (DZOazna aktivnost) spektrofotometrijski. Određen je i fenotip aktivnosti za položaj 192 (PON1Q192R). Koncentracija MPO određivana je komercijalnim ELISA testom. Za razdvajanje subfrakcija LDL i HDL korišćena je metoda vertikalne elektroforeze na nedenaturišućem gradijentu poliakrilamidnog gela.

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani osnovni demografski podaci, antropometrijske karakteristike i rezultati određivanja rutinskih biohemijskih parametara kod dece pacijenata sa HBB i kod zdravih ispitanika. Zatim je izvršeno poređenje dobijenih rezultata u odvojim podgrupama pacijenata u predijaliznom, dijaliznom i post-transplantacionom stadijumu, kao i u kontrolnoj grupi, a ispitivani parametri su uključivali pol, starost, indeks telesne mase (ITM), odnos struka i kuka (OS/OK), sistolni i dijastolni pritisak, te osnovne biohemijske parametre: ukupne proteine, glukozu, TG, UH, LDL-h, HDL-h, Slobodan holesterol, apoA-I, apoB, Lp (a) i aterogeni indeks plazme (AIP). Takođe, prikazani su parametri procene bubrežne funkcije između grupa pacijenata. U nastavku su predstavljeni su i rezultati poređenja dobijenih vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite: TKBRS, superoksidnog anjona, AOPP, SH grupa i SOD.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije za kontinuirane podatke, odnosno kao apsolutne frekvence za kategoričke podatke. Za poređenje dobijenih rezultata korišćena je analiza varijanse (ANOVA), kao i Chi-kvadrat (χ^2) test za kategoričke varijable.

Da bi se ispitalo eventualno postojanje korelacija između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa ostalim lipidnim i nelipidnim parametrima, korišćena je metoda Pearson-ove korelacione analize. Analiza je sprovedena za svaku grupu ispitanika posebno. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza je primenjena i da bi se utvrdilo

postojanje povezanosti POazne i DZOazne aktivnosti PON1 sa ispitivanim lipidnim i nelipidnim parametrima u sve četiri grupe ispitanika. Koncentracija antioksidativnog enzima MPO je ispitivana u cilju detaljnije evaluacije antioksidativnog statusa ispitanika, a sprovedena je Pearsonova parametarska korelaciona analiza povezanosti koncentracije MPO sa lipidnim i nelipidnim parametrima.

Da bi se ispitalo eventualno postojanje korelacije između AIP i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kao i ostalih lipidnih i nelipidnih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, korišćena je metoda Pearson-ove parametarske korelacione analize. Na osnovu rezultata Pearson-ove korelacione analize detaljnije je ispitana povezanost pomenutih parametara univarijantnom linearnom regresionom analizom. Da bi se utvrdilo da li ispitivani parametri imaju nezavisan uticaj na AIP, primenjena je multivarijantna linearna regresiona analiza. Model je napravljen na osnovu rezultata korelacione analize.

U nastavku su analizirane veličina i raspodela lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama. Dominantni HDL i LDL dijometri su poređeni između četiri grupe ispitanika. Takođe, ispitane su razlike u relativnim udelima pojedinačnih LDL i HDL subfrakcija u četiri grupe ispitanika. Za ove analize korišćena je ANOVA sa *post hoc* Tukey testom. Postojanje značajnih korelacija između analiziranih rutinskih antropometrijskih i laboratorijskih parametara sa karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija u sve četiri grupe ispitanika provereno je Pearsonovom korelacionom analizom. Takođe, istom analizom ispitano je postojanje značajnih korelacija između parametara oksidativnog stresa sa karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama.

U grupi pacijenata je određen cIMT u nivou zajedničke karotidne arterije (ACC) i unutrašnje karotidne arterije (ACI). Pearsonovim korelacionim testom ispitane su korelacije cIMT na nivou ACC sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija kod celokupne HBB grupe (uključujući pacijente u predijaliznom i dijaliznom stadijumu) i grupe pacijenata sa transplantiranim bubregom. Na kraju su ispitani su nezavisni faktori uticaja na pojavu povećanih relativnih udela malih HDL 3 subfrakcija. Kao kovarijable u ovoj analizi korišćeni su parametri koji su u prethodnoj korelacionoj analizi sprovedenoj u objedinjenoj grupi ispitanika dovedeni u vezu sa relativnim udelima HDL 3 subfrakcija.

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

B. Opis dobijenih rezultata

Ispitanici su podeljeni na kontrolnu grupu (KG) i grupu pacijenata pri čemu su ove grupe bile usklađene po polu i starosti. Grupom pacijenata su činili pedijatrijski pacijenti u predijaliznoj fazi HBB (pdHBB), pacijenti na dijalizi (D) kao i pacijenti nakon transplantacije bubrega (T). Rezultati analize parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite su pokazali da je aktivnost SOD bila je statistički značajno viša u grupi pacijenata na dijalizi u poređenju sa pdHBB grupom, kao i u poređenju sa grupom ispitanika sa transplantiranim bubregom. U grupi predijaliznih pacijenata sa HBB koncentracija TBKRS je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Apo B. Koncentracija SH-grupa je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti pacijenata, dok je aktivnost SOD bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom apoAI. Od svih ispitivanih parametara oksidativnog stresa u grupi pacijenata na dijalizi, jedino je koncentracija TBKRS bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom UH i koncentracijom apoB. U grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom, koncentracija TBKRS je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom TG. Nivo superoksidnog anjona je u ovoj grupi pacijenata bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, OS/OK, koncentracijama UH, LDL-h i apoB. POazna aktivnost je bila slična u sve četiri ispitivane grupe, dok je DZOazna aktivnost bila viša u kontrolnoj grupi ispitanika u odnosu na grupe pacijenata. Koncentracija enzima MPO bila je statistički značajno viša u pdHBB grupi u odnosu na zdrave ispitanike, kao i u odnosu na pacijente na dijalizi i pacijente sa transplantiranim bubregom. Koncentracija MPO je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa AIP i koncentracijom TBKRS u grupi D. U grupi T, koncentracija MPO je bila u pozitivnoj korelaciji sa AOPP i u negativnoj korelaciji sa SH-grupama. Rezultati u grupi zdrave dece su pokazali da je AIP u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom MPO. U pdHBB grupi, AIP bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, sistolnim pritiskom i koncentracijom TBARS. Rezultati univarijantne linearne regresione analize su pokazali da je AIP u ovoj grupi pacijenata značajno povezan sa sistolnim krvnim pritiskom. S druge strane, u grupi D AIP je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa dužinom trajanja dijalize, ITM, dijastolnim krvnim pritiskom, koncentracijom MPO kao i koncentracijom AOPP, dok je univarijantna linearna regresiona analiza izdvojila koncentraciju MPO i koncentraciju AOPP kao parametre koji su značajno povezani sa AIP. Rezultati multivarijantne linearne regresione analize su pokazali da su koncentracija MPO kao i koncentracija AOPP nezavisno povezani sa AIP kod pacijenata na dijalizi. Kod pacijenata

nakon transplantacije, koncentracije MPO, TBKRS i SH-grupa bile su u značajnoj korelaciji sa vrednostima AIP, a univarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da su jedino koncentracije TBKRS i AOPP značajno povezane sa AIP.

Ispitivanjem dominantnih LDL i HDL dijametara dobijene su statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Primenom *post hoc* analize utvrđeno je da se dominantni LDL dijametar u kontrolnoj grupi razlikuje u odnosu na pacijente u pdHBB grupi, a dominantni HDL dijametar kod dece nakon transplantacije bio je značajno veći u odnosu na druge dve grupe pacijenata sa HBB. Ispitivanjem raspodele LDL subfrakcija kod pacijenata sa HBB, uočeno je da pacijenti nakon transplantacije imaju povoljniji LDL profil u odnosu na pdHBB i D grupu, u smislu pomeranja ravnoteže ka većim česticama. Udeo malih HDL subfrakcija je bio značajno viši, a udeo velikih HDL 2b čestica i dominantni HDL dijametar značajno niži kod pacijenata sa HBB u odnosu na ispitanike sa transplantiranim bubregom.

Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom godine starosti ispitanika su bile u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 3b subfrakcija, dok je ITM pozitivno korelirao sa LDL dijametrom, a negativno sa relativnim udelom malih, gustih LDL čestica. Ispitivanjem korelacije subfrakcija LDL i HDL čestica sa parametrima oksidativnog stresa kod pacijenata na dijalizi utvrđeno je da je PON1 aktivnost bila je u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2a subfrakcija, a u pozitivnoj sa udelom HDL 3c subfrakcija. Aktivnost SOD je negativno korelirala sa udelom LDL IV subfrakcija. Koncentracija TBKRS je bila u pozitivnoj korelaciji sa dominantnim LDL dijametrom i relativnim udelom HDL 2b subfrakcija, a u negativnoj sa relativnim udelom HDL 3c čestica. Koncentracija MPO negativno korelirala sa dominantnim LDL dijametrom i relativnim udelom LDL I subfrakcija, a pozitivno sa relativnim udelom HDL 3b subfrakcija. U grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom uočena je pozitivna korelacija PON1 paraoksonazne aktivnosti sa relativnim udelom HDL 2a subfrakcija a koncentracija MPO je bila u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom subfrakcije HDL 3a.

Dalje je ispitivana vrednost MPO/PON1 odnosa u grupama pacijenata sa HBB i nakon transplantacije bubrega Statistički značajno viši MPO/PON1 odnos uočen je kod pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu u odnosu na pacijente sa transplantiranim bubregom. Takođe, ispitani su nezavisni faktori uticaja na pojavu povećanih relativnih udela malih HDL 3 subfrakcija. Dobijeni rezultati su pokazali da povišen odnos MPO/PON1 predstavlja značajan nezavisan faktor rizika za pojavu malih HDL subfrakcija.

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

Rezultati većeg broja istraživanja su ukazali da postojanje hronične inflamacije i oksidativnog stresa može imati ključnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih komplikacija kod pacijenta sa HBB (1-4). Naime, utvrđeno je da prisustvo uremijskih toksina, inflamacija, pa i sam proces dijalize u terminalnim fazama bolesti, dovode do intenziviranja oksidativnog stresa. Dejstvom slobodnih radikala dolazi do oksidativnog oštećenja proteina, a marker koji se pokazao dobrim pokazateljem intenziteta ovog oštećenja jeste koncentracija AOPP (5), dok se intenzitet lipidne peroksidacije i nagomilavanja produkata oksidacije lipida može pratiti merenjem koncentracije TBKRS (6). Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da je intenzitet oksidativnog stresa povišen kod pacijenata na dijalizi (5, 7). U ovoj doktorskoj tezi je utvrđeno da je koncentracija TBKRS statistički značajno veća u sve tri ispitivane grupe pacijenata u odnosu na KG. Takođe, dobijeni rezultati su pokazali da je koncentracija AOPP i nakon transplantacije bubrega značajno veća u odnosu na KG, ali ipak značajno niža u odnosu na pacijente na dijalizi.

Brojna istraživanja kod pacijenata sa HBB su pokazala da osim pojačanja intenziteta oksidativnog stresa postoji i smanjenje nivoa antioksidativne zaštite (5). U istraživanju urađenom u okviru ove doktorske disertacije ukupne SH-grupe su bile statistički značajno niže kod dece u pdHBB grupi i dece na dijalizi, u odnosu na KG i grupu dece kojima je transplantiran bubreg, što bi moglo da ukazuje na iscrpljenost antioksidativnih kapaciteta organizma usled povećanog oksidativnog stresa. Prethodna istraživanja su utvrdila i značajno smanjenje aktivnosti SOD kod pacijenata u predijaliznom stadijumu HBB zbog povećanog prisustva uremijskih toksina (8). Rezultati prikazane studije su takođe ukazali na značajno snižene vrednosti SOD u pdHBB grupi i kod transplantiranih pacijenata, ali i statistički značajno viši SOD u grupi pacijenata na dijalizi u poređenju sa KG.

Rezultati studija koje su se bavile proučavanjem enzima PON1 u HBB nisu konzistentni (9, 10), naročito vezano za uticaj procesa dijalize na koncentraciju i aktivnost ovog enzima. Generalno su rezultati prethodnih studija pokazali da su pacijenti sa HBB imali snižen nivo aktivnosti PON1, što svakako može biti uzrok povećanog rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (11, 12). Rezultati ove studije su pokazali smanjenje POazne i DZOazne aktivnosti kod dece na dijalizi u poređenju sa KG, ali rezultat nije dostigao statističku značajnost.

Najvažniji mehanizam putem koga oksidativni stres učestvuje u razvoju ateroskleroze je oksidativna modifikacija lipoproteina (5). Dosadašnja istraživanja ukazuju da

je MPO jedan od važnih induktora stvaranja slobodnih radikala kod nefroloških pacijenata (13,14). MPO koja je oslobođena ekstracelularno može katalizovati peroksidaciju lipoproteina i smatra se i glavnim uzrokom lipidne peroksidacije *in vivo* (15), a prospektivne studije su pokazale da se visoki nivoi MPO povezuju sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti kod zdravih pojedinaca (16). Kod bolesnika sa HBB izmenjena funkcionalnost MPO može ukazati na rizik od razvoja endotelnih promena i kardiovaskularnih komplikacija (17). Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske teze su pokazali statistički značajno višu koncentraciju MPO u pdHBB grupi u odnosu na KG, ali i u odnosu na ostale ispitivane grupe pacijenata, što ide u prilog tezi da postojanje HBB dovodi do pojačane produkcije MPO.

Iako je poznato da sve LDL čestice imaju izrazite proaterogene karakteristike, istraživanja su identifikovala najveći proaterogeni potencijal kod malih, gustih LDL čestica (18, 19). Ove čestice, zahvaljujući svojoj veličini lakše prodiru u subendotelni prostor, što ih čini podložnim oksidaciji (18), a upravo oksidativne promene indukuju veću aktivaciju monocita/makrofaga (20, 21). Rezultati prikazane studije su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije MPO i TBKRS u grupi pacijenata na dijalizi, što je upućuje na zaključak da se povećanje intenziteta oksidativnog stresa može dovesti u vezi sa većim stepenom lipidne peroksidacije. Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, nivo MPO nije bio statistički značajno različit u odnosu na KG, ali je pozitivno korelirao sa AOPP, a negativno sa SH-grupama .

Rezultati kliničkih studija su izdvojili AIP kao dobar prediktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze (22, 23). Važnost ovog markera je posebno istaknuta u kontekstu procene lipidnog statusa kod pacijenata sa hipertrigliceridemijom (24). Prema rezultatima analizirane studije, u grupi zdrave dece AIP je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju jedino sa koncentracijom MPO, dok je u grupi D AIP bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom MPO i AOPP. Dobijeni rezultati su ukazali da AIP može implicirati postepeno povećanje aterogenog rizika paralelno sa progresijom bolesti kod dece sa HBB. Na osnovu dokazanog nezavisnog uticaja parametara oksidativnog stresa na AIP kod pacijenata na dijalizi, ovaj parametar može indirektno da odražava stepen oksidativnog stresa koji je uzrokovalo oslobađanje MPO kao i povećanje AOPP.

Prethodne studije su utvrdile da je pedijatrijska populacija sa izmenjenom homeostazom lipida dugoročno ugrožena, jer promene u lipidnom profilu u ranom životnom dobu mogu povećati rizik od kardiovaskularnih komplikacija u odrasloj dobi (25). Dosadašnja istraživanja sugerišu da određivanje LDL profila u pedijatrijskoj populaciji ne daje dovoljno pouzdane rezultate za eventualnu kliničku interpretaciju (26). U ovoj studiji je

udeo najmanjih LDL IV subfrakcija bio značajno manji u grupi T u odnosu na pdHBB i D grupu zajedno, a pretpostavka je bila da ovaj rezultat odražava povoljni efekat transplantacije na lipidni profil.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su manje HDL subfrakcije posebno podložne promenama u uremijskoj sredini, tako da brzo gube svoje ateroprotektivne osobine i čak mogu postati proaterogene (27). Rezultati date studije su ukazali na statistički značajnu razliku u dominantnom HDL dijametru kod zdrave dece u KG odnosu na pdHBB i D grupu, dok je procentualni udeo malih HDL subfrakcija značajno niži kod KG, u odnosu na decu sa HBB. Rezultati su ukazali na značajno povoljniji HDL profil nakon transplantacije nego u toku trajanja HBB.

Odnos MPO/PON1 koji je nedavno predložen kao kompetentni indikator funkcionalnosti HDL čestica (28, 29). Rezultati ove studije su pokazali trend ka višim vrednostima MPO/PON1 kod pacijenata sa HBB, u odnosu na KG ili T grupu. Dobijene su statistički značajno veće vrednosti MPO/PON1 kod pacijenata u predijaliznom i dijaliznom stadijumu HBB u odnosu na T grupu, što je objašnjeno većom incidencom oksidativnog oštećenja kod HBB pacijenata nego kod pacijenata nakon transplantacije. Rezultati logističke regresione analize pokazali su da je odnos MPO/PON1 značajan i nezavisan prediktor povećane prisutnosti manjih HDL čestica. Haraguchi et al. (28) predložili su odnos MPO/PON1 kao koristan indeks oslabljene funkcionalnosti HDL čestica. U ovoj studiji nisu direktno istražene funkcionalne osobine HDL, ali je pokazano da povećan udeo manjih HDL čestica prati povećani odnos MPO/PON1.

D. Provera originalnosti doktorske disertacije

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

Program iThenticate je registrovao ukupno 18% poklapanja sa 171 izvorom. Preklapanje teksta sa tri izvora iznosi 2%, sa dva izvora 1%, a u svim ostalim slučajevima je sličnost teksta iznosila manje od 1%. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je podudarnost teksta posledica korišćenja ličnih imena, bibliografskih podataka, naziva metoda, reagenasa i određivanih analita, te opštih mesta i podataka u vezi sa temom disertacije.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Danijele Kornic u potpunosti originalna, ako i da su poštovana akademska pravila citiranja.

E. Zaključak- obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Dosadašnje preporuke o evaluaciji rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u pedijatrijskoj populaciji sa HBB zasnivaju se na kliničkom iskustvu i na naučnim istraživanjima koja su neretko izvođena kod odraslih pacijenata sa HBB. Zbog same prirode bolesti i činjenice da se radi o populaciji pedijatrijskih pacijenata uzrasta od 3 do 19 godina dobijeni podaci su veoma dragoceni.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazali su na postojanje povišenog nivoa oksidativnog stresa u svim grupama pacijenata sa HBB, kao i da je intenzitet oksidativnog stresa bio najviši kod pacijenata na dijalizi. Od velikog značaja je i činjenica da dobijeni rezultati ukazuju na povezanost oksidativnog stresa i dislipidemije u ovoj specifičnoj i vulnerabilnoj populaciji pedijatrijskih pacijenata. Takođe, utvrđeno je da je kod dece sa HBB dolazi do prilagođavanja antioksidativnih kapaciteta organizma na povećanu produkciju slobodnih radikala, ali i da je prisutno iscrpljivanje mehanizama antioksidativne zaštite. Važno je istaći pokazanu povezanost parametara oksidativnog stresa sa aterogenim indeksom plazme, što bi moglo da ima značajne kliničke implikacije, s obzirom na laku dostupnost ovog indeksa u rutinskoj laboratorijskoj praksi. Naime, rezultati ove disertacije impliciraju da bi aterogeni indeks plazme, ukoliko bi se određivao od momenta početka dijalize, mogao dati vrlo značajne informacije o stepenu oksidativnog stresa i na taj način uticati na buduće preventivne mere.

Budući da se značajan deo rezultata odnosio na ispitivanje raspodele lipoproteinskih čestica ova disertacija je doprinela aktuelnoj naučnoistraživačkoj problematici u vezi sa značajem ovakvih analiza u pedijatrijskoj populaciji. Naročito je važno istaći da su dobijeni rezultati ukazali na povoljan efekat transplantacije na kvalitativni lipoproteinski profil. Međutim, razlike u karakteristikama raspodele LDL i HDL subfrakcije kod dece nakon transplantacije i dalje su bile značajne u odnosu na kontrolnu grupu, što bi moglo da ima značajne implikacije u smislu tumačenja ukupnog kardiovaskularnog rizika kod mladih pacijenata sa transplantiranim bubregom. Naime, na osnovu dobijenih rezultata data je

pretpostavka da transplantacija ne uklanja u potpunosti rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

Konačno, veoma značajan rezultat ove disertacije odnosi se na utvrđenu vezu između MPO/PON1 odnosa i karakteristika raspodele HDL čestica. Na osnovu dobijenih rezultata postavljena je hipoteza po kojoj odnos MPO/PON1 može biti koristan pokazatelj oslabljene funkcionalnosti HDL čestica. Takođe, ovaj odnos bi se mogao smatrati lako dostupnim i korisnim indikatorom, sposobnim da pruži integrisanu informaciju o interakciji dislipidemije, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pedijatrijskih pacijenata sa HBB.

Literatura:

1. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clinical Kidney Journal*. 2016;9(4):583-591.
2. Kaspar AG, Bholah R, Bunchman TE. A Review of Pediatric Chronic Kidney Disease. *Blood Purif*. 2016;41(1-3):211-7.
3. National kidney Foundation Task force on Cardiovascular disease (1998) Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis*. 1998 Nov;32(5):853-906.
4. National Kidney Foundation. Clinical Practice Guidelines for Managing Dyslipidemias in Chronic Kidney Disease. K/DOQI guidelines. *Am J Kidney Dis* 2003;41(Suppl 3):S22–S38 .
5. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 2019; 34: 975-991.
6. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:538-48
7. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP , Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Dr • ke TB, Lacour B, Thenin M. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16: 335–340.
8. Mates J.M, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999; 32: 595-603
9. Solati M, Mahboobi HR. Paraoxonase enzyme activity and dyslipidemia in chronic kidney disease patients. *J Nephropathol*. 2012;1(3):123–125.
10. Prakash M, Phani N, Kavva R, Supriya M. Paraoxonase: Its anti-atherogenic role in

- chronic renal failure. *Indian J Nephrol.* 2010;20:9–14. 25.
11. Dirican M, Akca R, Sarandol E, Dilek K. Serum paraoxonase activity in uremic predialysis and hemodialysis patients. *J Nephrol.* 2004;17:813–8.
 12. Saeed SA, Elsharkawy M, Elsaeed K, Fooda O. Paraoxonase-1 (PON1) activity as a risk factor for atherosclerosis in chronic renal failure patients. *Hemodial Int.* 2008;12(4):471–9.
 13. Waradz B, Hebert D, Sulliva E. Renal transplantation, chronic dialysis and chronic renal insufficiency in children and adolescents. *Pediatric Nephrol.* 1997;11:49-64
 14. Wu CC, Chen JS. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1134–1139.
 15. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). An oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation, *Journ of Biol Chem.* 2003;31:28403–28409.
 16. Meuwese MC1, Stroes ES, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk prospective population study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:159–165.
 17. Kusic B, Miric D, Dragojevic I, Rasic J, Popovic Lj . Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:1069743.
 18. Tso, panidi EN, Brinkmeier MS, Fotidou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;208:39
 19. Delpotre C, Van Antwerpen P, Wanhamme L, Roumequere T, Boudgeltia KZ. Low –density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies. *Mediat Inflamm* 2013; 1-12
 20. Mekki K, Bouchenak M, Lamri M, Remaoun M, Belleville J. Changes in plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity HDL(2), HDL(3) amounts and compositions in patients with chronic renal failure after different times of hemodialysis. *Atherosclerosis.* 2002;162:409–417
 21. Florens W, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage C. Modified lipids and lipoproteins in chronic kidney disease: a new class of uremic toxins. *Toxins* 2016;8:376-401
 22. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index:

correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). Clin Biochem. 2001;34:583-8.

23. Dobiasova M. AIP—atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice. VnitrLek 2006; 52(1):64–71.

24. Lee MJ, Park JT, Han SH, Kim Y, Kim Y, Yang CW, Kim N, Kang S, Kim HJ, Yoo T. The atherogenic index of plasma and the risk of mortality in incident dialysis patients: Results from a nationwide prospective cohort in Korea. PloS ONE. 2017; 12:e0177499.

25. Halfon N, Verhoef PA, Kuo AA. Childhood antecedents to adult cardiovascular disease. Pediatr Rev. 2012;33:51–60.

26. Taşçılar ME, Özgen T, Cihan M, Abacı A, Yeşilkaya E, Eker I, Serdar M. The effect of insulin resistance and obesity on low-density lipoprotein particle size in children. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2010;2:63-66.

27. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. Atherosclerosis. 2010 ; 208(1):3-9.

28. Haraguchi Y, Toh R, Hasokawa M, Nakajima H, Honjo T, Otsui K, Mori K, Miyamoto-Sasaki M, Shinohara M, Nishimura K, Ishida T, Hirata K. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. Atherosclerosis. 2014 Jun; 234(2):288-94.

29. Kotur-Stevuljević J, Peco-Antić A, Spasić S, Stefanović A, Paripović D, Kostić M, Vasić D, Vujović A, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V, Kornic-Ristovski D. Hyperlipidemia, oxidative stress, and intima media thickness in children with chronic kidney disease. D Pediatr Nephrol. 2013 Feb; 28(2):295-303.

F. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Ristovski-Kornic D**, Stefanović A, Kotur J, Zeljković A, Spasojević-Kalimanovska V, Vekić J, Miljković M, Paripović D, Peco-Antić A, Ivanović Z. Association of Myeloperoxidase and the Atherogenic Index of Plasma in Children with End-Stage Renal Disease. J Med Biochem. 2016;36:23-31 (IF 1.148; kategorija časopisa M23);

2. Stefanović A, **Ristovski-Kornic D**, Kotur-Stevuljević J, Spasojević-Kalimanovska, V, Vekić J, Miljković M, Paripović D, Peco-Antić A, Jelić-Ivanović Z, Zeljković A. Alterations of HDL Particles in Children with End-Stage Renal Disease. J Med Biochem.

2017;36(4):358-365 (IF 1.378; rang časopisa M23 (8/30) u kategoriji Medical Laboratory Technology).

G. Mišljenje i predlog

Na osnovu svega izloženog smatramo da priložena doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos u oblasti medicinske biohemije. Prevencija razvoja ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti u pedijatrijskoj populaciji je od posebnog značaja u savremenom svetu, a deca i adolescenti sa hroničnim bolestima bubrega predstavljaju izuzetno vulnerabilnu grupu.

Ispitivanje povezanosti parametara oksidativno-stresnog statusa, enzima mijeloperoksidaze i raspodele subfrakcija lipoproteinskih čestica niske i visoke gustine u proceni kardiovaskularnog rizika kod dece i adolescenata sa hroničnim bolestima bubrega u našoj populaciji doprinosi boljem razumevanju procesa, kao i mogućnostima za prevenciju i smanjenju rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima.

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 **“Značaj određivanja mijeloperoksidaze i raspodele subfrakcija lipoproteinskih čestica niske i visoke gustine kod dece i adolescenata sa hroničnim bolestima bubrega”**, kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Danijele Kornic.

Beograd, 12.06.2019.

Prof. dr Aleksandra Stefanović,
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Aleksandra Zeljković,
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Zorana Jelić-Ivanović,
profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Doc. dr Dušan Paripović,
docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet