

**СЕКРЕТАРИЈАТУ ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА
КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ**

На седници Наставно-научног већа Фармацеутског факултета, одржаној 15. маја 2014. године, именована је Комисија у саставу:

1. Др Душко Мирковић, ванредни професор, Универзитет у Београду -
Фармацеутски факултет, ментор
2. Др Нада Мајкић-Singh, редовни професор у пензији, Универзитет у
Београду - Фармацеутски факултет
3. Др Светлана Игњатовић, редовни професор, Универзитет у Београду -
Фармацеутски факултет
4. Др Валентина Ђорђевић, научни сарадник, Универзитет у Београду -
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
5. Др Александра Дудварски-Илић, доцент, Универзитет у Београду -
Медицински факултет

за оцену завршене докторске дисертације под називом **"Утицај наследних и стечених фактора на ниво хомоцистеина у крви болесника са хроничном опструктивном болешћу плућа"** кандидата Анђела Белетића, специјалисте медицинске биохемије, запосленог у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра Србије. Комисија је прегледала приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација Анђела Белетића, специјалисте медицинске биохемије, под називом **"Утицај наследних и стечених фактора на ниво хомоцистеина у крви болесника са хроничном опструктивном болешћу плућа"**, написана је јасним и прегледним стилем на 111 страна, има 16 табела, 32 слике и 174

литературна навода. Садржај докторске дисертације је изложен у следећим поглављима: Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература.

Увод се састоји од три дела. У првом је приказан метаболизам хомоцистеина (Нсу), описани су облици Нсу у крви, наведени критеријум за поделу и узроци хиперхомоцистеиније (ННсу), објашњени механизми којима ННсу остварује штетне ефекте као и клинички значај ННсу, и на крају је дат краћи осврт на одређивање концентрације Нсу. Други део је посвећен хроничној обструктивној болести плућа (ХОБП). Започиње приказом података о епидемиологији и узроцима овог обољења, наставља се разматрањем патофизиолошких механизма одговорних за његов настанак и развој и завршава се приказом савременог дијагностичко терапијског приступа. Трећи део приказује податке о повезаности поремећаја метаболизма Нсу и ХОБП. Извори наведених података су студије спроведене на релативно малим групама оболелих у Јапану, Тринидаду и Тобагу односно Италији (1-3). Међу предикторима концентрације Нсу чији се ефекти испитивани код оболелих од ХОБП, за концентрације фолата и витамина Б₁₂ је показано да имају значајан ефекат, док то није био случај са старосћу и бубрежном функцијом. Разлике по полу, као и корелација са концентрацијом CRP су тестиране, међутим резултати су били неусаглашени. Тако, у тренутно доступној литератури нема података о повезаности полиморфизама у гену за метилентерахидрофолат редуктазу (MTHFR) и ННсу код болесника са ХОБП.

У складу са овим разматрањима постављен је и основни **циљ** дисертације - да се у групи болесника са ХОБП одреде ниво Нсу и инциденца ННсу, односно да се процени како на њих утичу пол, старост, полиморфизми MTHFR (C677T и A1298C) и концентрација фолата и витамина Б₁₂, као и да се процени да ли појава ННсу може представљати биомаркер дефицијенције поменутих витамина. Као додатне циљеве дисертација је имала испитивање повезаности нивоа Нсу и инциденце ННсу са присуством дефицијенције алфа-1-антитрипсина (AATD), до сада најбоље описаног генетског фактора ризика за

ХОБП, као и концентрацијом CRP, маркером инфламације код оболелих. Такође, циљ је био и да се процени заједнички утицај испитиваних фактора на ниво Hcy и инциденцу HHCy. У ширем контексту повезаности HHCy и тромбофилије, циљеви су обухватили и испитивање учесталости мутација FV Leiden и FII G20210A у истој групи болесника.

Поглавље **Материјал и методе** садржи податке о учесницима, начину сакупљања узорака и примењеним методама. Истраживање је укључило групу од 50 болесника из Клинике за пулмологију Клиничког центра Србије (28 мушкараца и 22 жене) којима је ХОБП дијагностикована пре 45. године живота. Просечна старост групе је била $49,0 \pm 14,5$ година (средња вредност \pm стандардна девијација). Критеријум за дијагностиковање ХОБП су били однос форсираног експиријумског волумена у првој секунди (FEV₁) и форсираног виталног капацитета плућа (FVC) мањи од 0,7 и FEV₁ испод 80%. Емфизем је био радиографски потврђен код 18 болесника. Амбулантно је било лечено 15, док је 35 хоспитализованих болесника укључено након стабилизације клиничке слике и постизања ремисије. Код испитиваних болесника није била присутна исхемијска болест срца, цереброваскуларни, бубрежни, гастроинтестинални и аутоимуни поремећаји, шећерна болест, као ни малигнитети. Контролну групу је сачињавало 48 здравих особа (20 мушкараца и 28 жена) старости $47,2 \pm 9,7$ година. Заједнички критеријуми за обе групе испитаника су били да су непушачи, не конзумирају алкохол и не добијају фолну киселину и/или витамин B₁₂ у терапијски или превентивно. Етички одбор Клиничког центра Србије је дао сагласност за спровођење истраживања.

Лабораторијска испитивања су урађена у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра Србије и Институту за молекуларну генетику и генетички инжењерство Универзитета у Београду. Венепункција је вршена ујутру, између 8 и 9 часова, након 12 часова гладовања после лаганог оброка без протеина животињског порекла. Серум је издвајан у року од 1 сата, а ДНК изолована коришћењем комерцијалног сета регенаса Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) из крви узорковане са натријум

цитратом. Концентрације Нсу, фолата и витамина Б₁₂ су одређиване хемилуминисцентним имуноодређивањем на микро честицама (СМІА), коришћењем комерцијалних сетова реагенаса (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany). ННсу је дефинисана као концентрација Нсу изнад 12 μmol/L. За анализу генских варијанти МТНFR С677Т и А1298С, односно FV Leiden и FII G20210А, коришћена је метода заснована на реакцији ланчаног умножавања полимеразом (PCR) и реверзној хибридизацији са алел-специфичним олигонуклеотидима (rASO) ("ThromboType® plus", Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). Присуство ААТД је испитивано применом интегративног алгорита који укључује имунонефелометријску анализу (N Antiserum to Human α1-Antitrypsin, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH), PCR-rASO ("GenoType® ААТ" Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), изоелектрично фокусирање на комерцијалним полиакриламидним геловима (Т=5%, С=3%; 245 x 110 x 1 mm) (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) и секвенцирање (BigDye Terminator Kit v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific brand of Waltham, Massachusetts, USA). За одређивање нивоа CRP коришћена је комерцијална имунонефелометријска метода (CardioPhase® hsCRP, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany). Расподела вредности континуираних варијабли је тестирана Shapiro-Wilk тест и у зависности од резултата вредности су изражене као медијане са инерквartilним односно распоном између минималних и максималних вредности, или као средње вредности са стандардном девијацијом. За испитиване факторе израчунаван је odds ratio (OR) са интервалом поузданости од 95% (95% CI). У статистичкој анализи резултата примењени су Студент t, Kruskal-Wallis и Mann-Whitney U тест, без и са Boniferroni корекције, односно тестови Chi-square, Fisher exact и McNemar Chi-square with exact P модулом, Spearman-ова непараметарска корелација, мултипла и логистичка регресиона анализа, као и Receiver Operating Characteristic (ROC) анализа.

Поглавље **Резултати** сачињава девет делова. Први део садржи поређење вредности концентрација Нсу и инциденце ННсу између болесника и контролне групе, као и процену значајности разлике у поменутиим параметрима између амбулантних и хоспитализованих болесника, односно оболелих са радиолошки доказаним емфиземом и без тог налаза. У наредних шест делова су приказани резултати о појединачном утицају испитиваних фактора на ниво Нсу и инциденцу ННсу код оболелих од ХОБП, док је осми део приказао њихове комбиноване ефекте на поменуте варијабле. У последњем делу приказани су резултати о учесталости мутација FV Leiden и FII G20210A код болесника укључених у студију.

Б. Опис постигнутих резултата

Ниво Нсу код болесника 13,22 (5,92–40,22) $\mu\text{mol/L}$ је био већи ($P < 0,001$) у односу на вредност код контролне групе 9,80 (5,30–30,90) $\mu\text{mol/L}$. Инциденца ННсу међу оболелима је била за 47% већа него међу испитаницима у контролној групи, што је такође представљало значајну разлику ($P < 0,001$). OR од 3,889 (1,677–9,017) је указао да је ХОБП значајан фактор ризика за појаву ННсу ($P = 0,002$).

Између болесника мушког и женског пола није било значајне разлике у нивоу Нсу ($P = 0,282$) нити учесталости ННсу ($P = 0,753$). Мушки болесници су имали веће концентрације Нсу ($P = 0,019$) и учесталост ННсу ($P = 0,019$) у односу на здраве мушкарце. Аналогне разлике су уочене и међу испитаницама, како у погледу концентрације Нсу ($P = 0,003$), тако и по инциденци ННсу ($P < 0,001$). За мушки пол као фактор ризика за настанак ННсу израчуната је вредност OR од 1,167 (0,346–3,933), која није била статистички значајна ($P = 0,804$).

Вредност Spearman-овог коефицијента (ρ_s) за корелацију између старости болесника и нивоа Нсу од 0,039 није указивала на значајну повезаност ($P = 0,786$). За контролну групу израчунат је ρ_s од 0,199, који такође није био

значајан ($P=0,175$). Старост изнад 50 година није била значајан фактор ризика за ННсу код оболелих је ($OR=0,561$ ($0,164-1,918$), $P=0,357$).

Фреквенце МТНFR С677Т алела у испитиваној групи болесника су износиле 62,2% за С и 37,8% за Т алел. Разлике у концентрацији Нсу између генотипова СС и ТТ односно СТ и ТТ су биле значајне ($P=0,012$ за СС/ТТ тј. $P=0,002$ за СТ/ТТ), али између генотипова није било значајне разлике у учесталости ННсу ($P=0,111$). OR за присуство Т алела као фактора ризика за ННсу од 2,857 ($0,899-9,989$) такође није био статистички значајан ($P=0,100$). За полиморфизам МТНFR А1298С алелне фреквенције су износиле 70,0% за А и 30,0% за С алел, при чему је уочено одступање од Hardy Weinberg-ове равнотеже ($P=0,024$) у смислу веће учесталости СС генотипова. Међу болесницима са различитим МТНFR А1298С генотиповима нису доказане значајне разлике у концентрацији Нсу ($P=0,610$) односно учесталости ННсу ($P=1,000$). OR за присуство С алела као фактора ризика за ННсу од 0,583 ($0,172-1,974$) није био статистички значајан ($P=0,386$). Комбиновано присуство МТНFR 677 Т и МТНFR 1298 С алела није показало значајан утицај на ниво Нсу ($P=0,174$) ни учесталост ННсу ($P=0,705$). У случају комбинованог присуства OR вредности су износиле 2,705 ($0,677-10,806$) за Т односно 0,882 ($0,222-3,497$) за С алел. Наведене вредности нису биле статистички значајне ($P=0,159$ за Т односно $P=0,858$ за С алел).

Корелација концентрација Нсу и фолата ($\rho_s=-0,138$) није била значајна ($P=0,340$), за разлику од повезаности нивоа Нсу и витамина Б₁₂ ($\rho_s=-0,310$, $P=0,029$). Додатно, болесници код којих је дошло до развоја ННсу имали су значајно ниже концентрације витамина Б₁₂ у поређењу са онима који су имали концентрацију Нсу испод 12,0 $\mu\text{mol/L}$ ($P=0,010$), док разлике у нивоу фолата нису биле значајне ($P=0,281$). Такође, није показано да присуство полиморфизама у гену за МТНFR показује утицај на ниво фолата код испитиваних болесника. Приликом испитивања значаја дефицијенције витамина као фактора ризика за настанак ННсу, као cut-off вредности за фолат коришћене су концентрације од 4,0, 6,6 и 8,0 $\mu\text{g/L}$, односно 203 и 473

ng/L за витамин B₁₂. Ни за једну од испитиваних cut-off вредности није доказано да је OR статистички значајан. Приликом испитивања поузданости појаве HHCy као предиктора дефицијенције витамина, као cut-off вредности за HHCy коришћене су концентрације Hcy од 10, 12 и 15 μmol/L. Међутим резултати ROC анализе су показали да поузданост одређивања Hcy као маркера дефицијенције фолата односно витамина B₁₂ није задовољавајућа.

Присуство AATD је откривено код 7 болесника (пет хомозиготних носилаца Z алела, два са комбинованим хетерозиготним присуством Z и ретких алела, M_{malton} и Q_{0amersfoort}), док су 10 болесника били хетерозиготни носиоци (8 са MZ и 2 са MS генотипом). Концентрације алфа-1-антитрипсина (AAT) и Hcy нису биле у значајној корелацији ($\rho_s = -0,046$, $P = 0,750$). Разлике у нивоу Hcy између болесника са различитим генотиповима нису биле значајне ($P = 0,115$). Нису доказане ни разлике у нивоу Hcy ($P = 0,785$) односно учесталости HHCy (0,249) између оболелих са AATD, хетерозиготних носилаца и болесника без AATD. Међутим, уочен је тренд присуства виших концентрација Hcy код болесника који су носиоци ретких алела гена за AAT. Испитивање AATD код болесника укључених у студију је омогућило и процену ефикасности интегративног лабораторијског алгорита за детекцију AATD. Концентрација AAT код болесника са AATD је била значајно нижа у поређењу са хетерозиготним носиоцима ($P < 0,001$) и болесницима без AATD ($P < 0,001$), при чему није показана значајна разлика између последње две групе болесника ($P = 0,125$), а код половине хетерозигота ниво AAT је био у референтном опсегу. Процене о ефикасности детекције AATD, уколико би се користио "screen-ing" приступ заснован на концентрацији AAT, указују да би 5 хетерозиготних носилаца остало недетектовано, док генотип код болесника са AATD који су двоструки хетерозиготи за Z и ретке алеле не би могао бити поуздано одређен. Без обзира на ове податке, интегративни алгоритам није показао бољу ефикасност у детекцији AATD ($P = 0,500$), односно хетерозиготних носилаца ($P = 0,063$).

Концентрација CRP је била значајно већа код болесника него у контролној групи ($P=0,032$), међутим није била у корелацији са нивоом Hcy ни код оболелих ($\rho_s=-0,046$, $P=0,749$) ни код здравих испитаника ($\rho_s=-0,034$, $P=0,818$). Такође, није показано да се вредности CRP значајно разликују у зависности од тога да је код болесника присутна HHcy ($P=0,743$).

Први резултат приликом процене заједничког утицаја испитиваних фактора је био да је значај присуства ХОБП као фактора ризика за развој HHcy подједнак код мушкараца и жена, односно да на њега немају утицај старост особе, присуство MTHFR 677 T алела и повишене вредности CRP. Додатно је уочено да поменути чиниоци не представљају значајне факторе ризика за настанак HHcy. Испитивани наследни и стечени фактори су одговорни за 64,7% варијације у концентрацији Hcy код испитиваних болесника. Као значајни предиктори идентификовани су MTHFR 677 TT генотип (у просеку доводи до пораста концентрације Hcy за $9,037 \mu\text{mol/L}$), концентрација витамина B₁₂ (пораст од 1 ng/L доводи до просечног снижења концентрације Hcy за $0,007 \mu\text{mol/L}$) и присуство AATD (повезује са просечним порастом концентрације Hcy од $9,558 \mu\text{mol/L}$). Анализа заједничких ефеката испитиваних чинилаца указала је да је дефицијенција витамина B₁₂, дефинисана као концентрација мања од 473 ng/L , представља једини значајан фактор ризика за настанак HHcy ($P=0,028$), односно да њено присуство повећава ризик за настанак HHcy око 14 пута.

Фреквенција мутације FV Leiden у испитиваној групи оболелих је износила 2%, док ни код једног болесника није доказано присуство мутације FII G20210A. Овакви резултати се не разликују значајно од фреквенција са којом се наведене мутације јављају у популацији здравих особа са територије Републике Србије ($P=0,439$ за FV Leiden и $P=0,171$ за FII G20210A).

В. Упоредна анализа резултата кандидата са подацима из литературе

Резултати истраживања указују да у је у испитиваној групи болесника са ХОБП ниво Hcy за $3,42 \mu\text{mol/L}$ односно приближно 25% виши у односу на

здраве особе исте старости. У претходним студијама код болесника са ХОБП аналогне разлике су биле изражене у различитом степену. Код јапанских болесника просечна вредност концентрације Нсу је била већа за приближно 31% односно 13% у зависности да ли је поређена са нивоом код непушача или код пушача са очуваном плућном функцијом (1). Seemungal и сарадници (2) су код здравих особа уочили ниво Нсу нижи за око 21% него код оболелих од ХОБП. За групу италијанских болесника је нађени ниво Нсу био за приближно 17% виши него у контролној групи разлика (3). Литературни подаци говоре у прилог томе да је разлику у нивоу Нсу, уочену између групе болесника и контролне групе у овој студији, оправдано сматрати значајном и са клиничког аспекта. Процењено је да пораст концентрације Нсу од 2,5 $\mu\text{mol/L}$ последично увећава укупни кардиоваскуларни ризик за 10% (4). Резултати мета-анализа су показали да присуство благе ННсу 2-3 пута увећава ризик за настанак венског тромбоемболизма, при чему је повећање ризика посебно изражено код болесника млађих од 60 година (5). Код 75% болесника са ХОБП укључених у студију била је присутна ННсу, што представља три пута већу учесталост него у контролној групи. Обзиром да резултати претходних студија о повезаности ННсу и ХОБП не укључују податке о учесталости ННсу, наведени резултат представља прву процену о појави овог метаболичког поремећаја код оболелих особа. Резултати студије су показали да је код оболелих од ХОБП 3,9 пута повећан ризик од настанка ННсу. Код италијанских болесника ХОБП и ННсу су били повезани на сличан начин, са том разликом што је ризик био повећан 1,3 пута (3). Seemungal и сарадници (2) су повезаност испитивали мултиплом регресионом анализом и утврдили да је присуство ХОБП значајан позитиван предиктор нивоа Нсу.

Ниво Нсу се није разликовао између мушких и женских болесника у овој студији. За разлику од њих, у контролној групи је показано да је концентрација Нсу виша код мушкараца него код жена, што је у складу са раније објављеним литературним подацима (6). Наведени резултати су сагласни са налазима студије у групи италијанских болесника, у којој такође није показана значајна

разлика у нивоу Hcy између мушкараца и жена (2). Насупрот овим запажањима, Seemungal и сарадници (3) су и код испитиваних болесника показали да је ниво Hcy виши код мушкараца.

Старост и ниво Hcy нису били у значајној корелацији ни код болесника ни у контролној групи. Добијени резултати нису били у сагласности са претходним литературним наводима који су и старост, поред пола, означили као најзначајнију биолошку детерминанту концентрације Hcy (6). Аналогно подацима о утицају пола, претходне студије код болесника са ХОБП су дале и различите резултате по питању корелације са старашћу. Резултати Seemungala и сарадника (2), слично резултатима у дисертацији, нису указали да постоји значајна корелација, док је код италијанских болесника је доказан значајан степен повезаности између старости болесника и концентрације Hcy (3).

Резултати добијени у овој тези представљају прве податке о учесталости полиморфизама MTHFR C677T и A1298C код оболелих од ХОБП. Поређење са фреквенцијом MTHFR 677 T алела у контролној групи, као и са литературним подацима (7, 8) упућује на закључак да он није заступљенији код оболелих од ХОБП у односу на здраве особе. До аналогног закључка се долази и поређењем расподеле MTHFR A1298C генотипова са литературним наводима (7, 8). Резултати испитивања утицаја ових полиморфизама на ниво Hcy су потврдили податке из литературе, с тим што се мора нагласити да је разлика у нивоу Hcy, повезана са хомозиготним присуством MTHFR 677 T алела, била дупло израженија у односу на литературне наводе (6, 8, 9). Међутим, литературни подаци који наводе повећан ниво Hcy код особа код којих су присутна оба полиморфизма (6, 8, 9) нису потврђени резултатима тезе.

Просечне вредности концентрације фолата односно витамина B₁₂, измерене код болесника укључених у студију, су се разликовале у односу на нивое који су добијени у претходним студијама код оболелих од ХОБП. Тако су у истраживању на шведским болесницима добијене више вредности фолата и витамина B₁₂ (10), док су у италијанској групи вредности биле ниже како за фолат, тако и за витамин B₁₂ (3). У интерпретацији поменутих разлика треба

узети у обзир чињеницу да су у болесници у шведској студији били старији, као и да није наведен прецизан податак о методи мерења нивоа витамина (10), док је у италијанска група формирана од болесника који су најмање 6 месеци били у ремисији (3). Осим тога резултати су показали да, за разлику од здраве популације (11, 12), пол и старост не утичу на ниво Нсу код оболелих од ХОБП. Резултати дисертације нису показали значајну корелацију нивоа фолата и Нсу, док је код витамина Б₁₂ уочена значајна негативна повезаност. Seemungal и сарадници нису нашли повезаност дефицијенције фолата и витамина Б₁₂ са концентрацијом Нсу. Међутим применљивост њиховог закључка је ограничена чињеницом да нивои витамина нису одређивани, већ су били процењени поређењем података из "food frequency" упитника са препорученим дневним уносом витамина (2). У групи италијанских болесника добијена је значајна корелација нивоа Нсу и концентрације фолата, док је повезаност са концентрацијом витамина Б₁₂ описана као тренд без статистичког значаја (3). Концентрације фолата се нису разликовале између болесника са различитим МТНFR С677Т генотиповима, што није било у сагласности са претходним подацима из литературе (7-9). Када је у питању полиморфизам МТНFR А1298С, резултати студије су потврдили претходне податке да нема утицаја на концентрацију фолата (8, 9). У ширем контексту повезаности метаболизма Нсу и недостатка витамина, резултати тезе прелиминарно указују и на неизвесну поузданост хомоцистеина као метаболичког маркера недостатка фолата и витамина Б₁₂ код оболелих од ХОБП.

Посматрано искључиво са статистичког становишта резултати студије нису потврдили повезаност поремећаја метаболизма Нсу и ААТД. Међутим, од укупно три болесника са умереном ННсу два су имала и тежак облик ААТД, узрокован комбинованим хетерозиготним присуством Z и ретких алела SERPINA1 гена. Важно је нагласити да је највећа концентрација Нсу у студији (40,22 μmol/L) измерена код болеснице у чијем су генотипу били присутни Z и нулти алел Q0amersfoort, која при томе није била носилац полиморфизама МТНFR С677Т и А1298С нити је имала недостатак фолата и витамина Б₁₂. И

појединачно запажање, попут овог, говори у прилог томе да болесници, генетски предиспонирани за ХОБП услед присуства нултих алела SERPINA1, у патофизиолошком и клиничком погледу предстаљају специфичну групу (13). ААТД је, применом интегративног алгорита, детектована код 14% болесника укључених у студију што је значајно више у поређењу са литературним подацима о проценту особа са ААТД детектованих међу оболелима од ХОБП, како у иностраним (0,5-10,4%) (14) тако и у српској популацији (2,3%) (15). Важно је истаћи и да је налаз присуства Q0amersfoort алела код болеснице у овој студији први податак о његовом присуству у српској популацији, док је, према расположивим подацима, болесник са генотипом ZM_{malton} друга особа са таквим генотипом детектована у српској популацији (16).

На основу резултата истраживања закључено је да корелација између нивоа CRP и Hcy није значајна ни код оболелих ни у контролној групи, што је у сагласности да резултатима код италијанских болесника (3). Насупрот оваквим запажањима, у студији Seemungal и сарадника (2) је показано да је повећан ниво CRP у значајној позитивној корелацији са концентрацијом Hcy.

Резултати дисертације указују да пол, старост, MTHFR 677 T алел и повишене вредности CRP не показују значајан модулациони ефекат на вероватноћу настанка HHcy код оболелих од ХОБП. Код италијанских болесника је доказано да пушачки стаж утиче на асоцијацију ХОПБ и HHcy, док ефекти системске инфламације, бубрежне и срчане слабости нису значајни (3). Заједничко деловање генетских и стечених фактора одговорно за чак 65% варијације у нивоу Hcy код испитиваних болесника, а као значајни предиктори су се показали присуство MTHFR 677 TT генотипа, дефицит витамина B₁₂ (дефинисан cut-off-ом од 473 ng/L) и присуство ААТД. Овакви резултати се донекле разликују од налаза код Италијана оболелих од ХОБП, који указују да су концентрације фолата и витамина B₁₂, заједно са нивоом триглицерида, значајни предиктори концентрације Hcy код болесника са ХОБП (3).

Међу испитиваним болесницима је идентификован један хетерозиготни носилац мутације FV Leiden, док присуство мутације FII G20210A није доказано

ни код једног од болесника укљученог у студију. Овакви резултати, сагласни са постојећим подацима о учесталости у здравој популацији Републике Србије (5,83% за FV Leiden, 4,12% за FII G20210A) (17), би могли пружити доказ да повећан ризик од венског тромбоемболизма код оболелих од ХОБП (18) не би требало приписати повећаној инциденци ових мутација.

Литература

1. Kai S, Nomura A, Morishima Y, Ishii Y, Sakamoto T, Hegab AE, Sekizawa K. The effect of smoking-related hyperhomocysteinemia on spirometric declines in chronic obstructive pulmonary disease in elderly Japanese. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 117-24.
2. Seemungal TA, Lun JC, Davis G, Neblett C, Chinyepi N, Dookhan C et al. Plasma homocysteine is elevated in COPD patients and is related to COPD severity. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007; 2: 313-21.
3. Fimognari FL, Loffredo L, Di Simone S, Sampietro F, Pastorelli R, Monaldo M et al. Hyperhomocysteinaemia and poor vitamin B status in chronic obstructive pulmonary disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19: 654-9.
4. Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Travares de Almeida I. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 3-20.
5. Božič-Mijovski M. Hyperhomocysteinemia and thrombophilia. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(Suppl 1): 89-95.
6. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3-32.
7. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
8. Kölling K, Jin Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C

- polymorphisms, plasma homocysteine, folate and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1201-6.
9. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014; 533: 11-20.
 10. Andersson I, Grönberg A, Slinde F, Bosaeus I, Larsson S. Vitamin and mineral status in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J* 2007; 1: 23-9.
 11. Zappacosta B, Persichilli S, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Graziano M, Gervasoni J et al. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in an Italian blood donor population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 473-80.
 12. WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2012. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EP_G_12.1_eng.pdf. Приступано 10. априла 2014.
 13. Fregonese L, Stolka J, Frants RR, Veldhuisen B. Alpha-1 antitrypsin Null mutations and severity of emphysema. *Resp Med* 2008; 102: 876-84.
 14. Stoller JK, Brantly M. The challenge of detecting alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD* 2013; 10(Suppl1): 26-34.
 15. Topic A, Stankovic M, Divac-Rankov A, Petrovic-Stanojevic N, Mitic-Milikic M, Nagorni-Obradovic L, Radojkovic D. Alpha-1-antitrypsin deficiency in Serbian adults with lung diseases. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16: 1282-6.
 16. Topic A, Jelic Z, Ilic A. A case of severe alpha-1 antitrypsin deficiency associated with the rare Pi MmaltonZ genotype. *Balkan J Clin Lab* 1995; 2: 95.
 17. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D et al. Prevalence of factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol* 2004; 112: 227-9.

18. Cavallès A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S et al. Comorbidities of COPD. *Eur Respir Rev* 2013; 22: 454-75.

Г. ОБЈАВЉЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ САСТАВНИ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Beletić A, Mirković D, Dudvarski-Ilić A, Milenković B, Nagorni-Obradović Lj, Đorđević V, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Questionable reliability of homocysteine as the metabolic marker for folate and vitamin B₁₂ deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Biochem* [Epub ahead of print].
Доступно на <http://dx.doi.org/10.2478/jomb-2014-0046>. Приступано 3. јуна 2014.

Тип рада: Original paper (Оригинални научни рад)

Импакт фактор: 1,084 (2012)

Ранг часописа: 254/290 у категорији Biochemistry & Molecular Biology

2. Beletic A, Dudvarski-Ilic A, Milenkovic B, Nagorni-Obradovic Lj, Ljujic M, Djordjevic V, Mirkovic D, Radojkovic D, Majkic-Singh N. Is an integrative laboratory algorithm more effective in detecting alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with premature chronic obstructive pulmonary disease than AAT concentration based screening approach. *Biochem Med* 2014; 24: 293-8.

Тип рада: Original paper (Оригинални научни рад)

Импакт фактор: 1,873 (2012)

Ранг часописа: 13/32 у категорији Medical Laboratory Technology

Г. ЗАКЉУЧЦИ

У дисертацији је показано да оболели од ХОБП имају у просеку 25% већи ниво Нсу и три пута већу учесталост ННсу у односу на здраве особе, као и да присуство ХОБП приближно 3,9 пута повећава ризик од настанка ННсу. Пол и старост не утичу на ниво Нсу и инциденцу ННсу код испитиваних болесника. Међутим, пораст концентрације Нсу односно инциденце ННсу у односу на здраве особе је знатно израженији код женских болесника. Фреквенција МТНFR 677 Т алела код испитиване групе болесника је 37,8%, док је МТНFR 1298 С алел присутан код 30,0% оболелих. Повећана концентрација Нсу је присутна код болесника са МТНFR 677 ТТ генотипом, док се МТНFR 1298 С алел не може повезати са разликама у нивоу Нсу. Такође присуство поменутих алела не доводи до повећане учесталости ННсу. Ниво Нсу код болесника није повезан са концентрацијом фолата, али показује значајну негативну корелацију са нивоом витамина Б₁₂. Појава ННсу није поуздан маркер дефицита поменутих витамина у испитиваној групи оболелих. Присуство ААТD није повезано са концентрацијом Нсу и инциденцом ННсу. Међутим, уочен је тренд присуства виших концентрација Нсу код болесника који су носиоци ретких алела SERPINA1 гена. Присуство ХОБП подједнако повећава ризик од настанка ННсу код особа различитог пола и старости, а ризик не зависи од присуства МТНFR 677 Т алела и повишених вредности CRP. Заједнички утицај испитиваних фактора је одговоран за приближно 65% варијације у нивоу Нсу код болесника у студији. Значајне предикторе концентрације Нсу представљају МТНFR 677 ТТ генотип, недостатак витамина Б₁₂ и присуство ААТD. Међутим, једино недостатак витамина Б₁₂ представља

фактор ризика за настанак ННсу код испитиваних болесника. Фреквенције мутације FV Leiden у испитиваној групи оболелих не разликују значајно од фреквенција у популацији здравих особа са територије Републике Србије.

Резултати из ове докторске дисертације су публиковани у два рада у међународним научним часописима, категорије M22 и M23.

Г. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу свега што је изложено у докторској дисертацији сматрамо да је кандидат оправдао постављене циљеве истраживања, као и да овај рад представља значајан научни допринос за област медицинске биохемије. Стога предлажемо Наставно-научном већу Фармацеутског факултета да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **"Утицај наследних и стечених фактора на ниво хомоцистеина у крви болесника са хроничном опструктивном болешћу плућа"** и одобри кандидату јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. _____

Др Душко Мирковић, ментор

ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

2. _____

Др Нада Мајкић-Singh,

редовни професор у пензији, Универзитет у Београду - Фармацеутски

факултет

3. _____

Др Светлана Игњатовић

редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

4. _____

Др Валентина Ђорђевић, научни сарадник, Универзитет у Београду -

Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

5. _____

Др Александра Дудварски-Илић
доцент, Универзитет у Београду - Медицински факултет

Београд, 11. јун 2014.