

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, datum imenovana je Komisija u sastavu

1. Dr. Zorana Jelić Ivanović, redovni profesor, mentor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr. Jelena Kotur Stevuljević, vanredni profesor, mentor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Dr. Aleksandra Stefanović, docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. Dr. Jelena Vekić, docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
5. Dr. Violeta Vučinić Mihailović, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom "**Ispitivanje pokazatelja inflamacije, oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod pacijenata sa sarkoidozom**" kandidata diplomiranog farmaceuta Jasmine Ivanišević, asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 137 strana, ima 42 tabele, 22 slike i 160 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispituju inflamatorni, oksidativno-stresni i lipidni status, raspodela LDL i HDL subfrakcija i PON1 status kod pacijenata sa sarkoidozom u odnosu na grupu zdravih ispitanika, kao i između različitih tokova/manifestacija bolesti. Cilj je bio i da se analizira međusobna povezanost navedenih

parametara u svim grupama, zatim da se proceni da li su neki parametri nezavisno povezani sa drugim parametrima ili kliničkim tokom oboljenja, kao i da se proveri dijagnostička tačnost parametara lipidnog i oksidativno-stresnog statusa kao prediktora postojanja bolesti.

U poglavlju **Materijali i metode** dati su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U ispitivanju je učestvovalo 213 pacijenata sa sarkoidozom i 139 zdravih osoba. Dijagnoza sarkoidoze je postavljena na osnovu preporuka sadržanih u ACCESS studiji (A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis) i to prema kliničkim, radiološkim i histološkim nalazima. Pacijenti su bili podeljeni prema toku sarkoidoze na one sa akutnom bolešću – 94 pacijenta i one sa hroničnom bolešću – 119 subjekata, a prema manifestaciji oboljenja na pacijente sa izolovanim plućnim oboljenjem – 142 pacijenta i sa kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću – 71 pacijent. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i odobrena od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Biohemijski parametri su određeni u serumu, plazmi i hemolizatima eritrocita. Koncentracije osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara su određene rutinskim laboratorijskim metodama, koncentracija hsCRP-a pomoću imunoturbidimetrijske metode, aktivnost ACE kolorimetrijskom metodom. SAA je određen primenom ELISA testa. Parametri oksidativno-stresnog statusa i PON1 su izmereni odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija je rađeno gradijent gel elektroforezom, a kvantifikacija je izvršena denzitometrijski. Određeni su i parametri plućne funkcije kod pacijenata.

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani demografski podaci, osnovni biohemijski i lipidni parametri za pacijente sa sarkoidozom i zdrave osobe: zastupljenost pola, starost, ITM, glukoza, urea, kreatinin, mokraćna kiselina, ukupni proteini, albumin, UH, HDL-H, LDL-H, TG, TG/HDL-H indeks, zastupljenost niske koncentracije HDL-H i visoke koncentracije TG. Inflamatorni parametri hsCRP i SAA su takođe dati za obe grupe ispitanika. Parametri plućne funkcije, plućni radiografski stadijum, kao i ACE su predstavljeni za grupu pacijenata.

Dalje su prikazani rezultati dobijeni za parametre oksidativnog stresa: MDA, O_2^- , TOS, PAB i antioksidativne zaštite: TAS, SOD, SH grupe u serumu i eritrocitima pacijenata i zdravih ispitanika. Analizirana je povezanost markera serumskog i eritrocitnog oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima kod obe grupe ispitanika. U sledećoj fazi proveravana je sposobnost parametara oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa da predvide prisustvo bolesti, kao i njihova dijagnostička tačnost u razlikovanju pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika.

Poređenja veličine (dominantnog LDL i HDL dijametra) i raspodele LDL (LDL I, LDL II, LDL III, LDL IV) i HDL (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b, HDL 3c) subfrakcija između pacijenata sa sarkoidozom i zdravih osoba su predstavljena u nastavku rezultata.

Zatim su dati podaci dobijeni za optimizaciju metode za određivanje PON1 aktivnosti i gde je to bilo moguće, u zavisnosti od primenjene koncentracije soli, utvrđene su granice između fenotipova PON1, a prikazani su i rezultati za frekvence fenotipova i alela enzima PON1 u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata. U daljoj analizi date su razlike POazne i DZOazne aktivnosti PON1 između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom, kao i razlike u pomenutim aktivnostima u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata prema PON1 fenotipovima. Postojanje veza PON1 aktivnosti sa inflamatornim, lipidnim i parametrima oksidativno-stresnog statusa je prikazana u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata, a zatim je testiran i nezavisni uticaj inflamacije i oksidativnog stresa na PON1 kod pacijenata.

Da bi se utvrdilo postojanje razlike između kliničkih tokova bolesti, izvršeno je poređenje svih prethodno navedenih parametara između pacijenata sa akutnim i hroničnim tokom bolesti, kao i zdravih ispitanika. Povezanost parametara inflamacije sa lipidima, raspodelom LDL i HDL subfrakcija, oksidativno-stresnim statusom i PON1 aktivnošću stresom je prikazana posebno u akutnoj i hroničnoj sarkoidozi. Ispitan je i nezavisni uticaj LDL i HDL subfrakcija i oksidativno-stresnog statusa na tok bolesti.

U sledećoj fazi izvršeno je poređenje svih parametara između pacijenata sa izolovanom plućnom i kombinovanom plućnom i vanplućnom bolesti, kao i zdravih ispitanika. U daljoj analizi posebno za plućnu i posebno za kombinovanu plućnu i vanplućnu bolest, rađene su korelacije između LDL i HDL subfrakcija i parametara inflamacije, lipidnih, parametara oksidativno-stresnog statusa i PON1 statusa. Nezavisni uticaj parametara oksidativno-stresnog statusa na distribuciju malih HDL čestica je testiran u izolovanoj plućnoj sarkoidozi.

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

B. ANALIZA REZULTATA

Rezultati pokazuju da su koncentracije hsCRP-a, UH, eritrocitnog TOS-a, relativnog udela LDL IVA, HDL 2a i HDL 3a subfrakcija, kao i SAA, TG, TG/HDL-H, relativnog udela LDL II i LDL III subfrakcija, serumskih koncentracija MDA, TOS-a, PAB-a, eritrocitnih koncentracija MDA, O_2^- , SH grupa značajno veće, dok su koncentracije HDL-H, eritrocitne

aktivnosti SOD-a, serumskih koncentracija SH grupa, relativnog udela LDL I subfrakcija, serumskih koncentracija TAS-a i aktivnosti SOD značajno manje kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.

Utvrđeno je da u grupi pacijenata postoji više značajnih korelacija između parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima. Serumski i eritrocitni MDA su se izdvojili kao najbolji parametri u predviđanju prisustva bolesti kad se porede sa drugim parametrima oksidativno-stresnog statusa. Oba parametra su zadržala svoju prediktivnu sposobnost i nakon podešavanja za druge parametre oksidativno-stresnog statusa, kao i za lipidne parametre. S-MDA je pokazao izvanredan, a S-TOS odličan potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika. Modeli sačinjeni od kombinacije više oksidanasa i/ili antioksidanasa su imali bolji potencijal razdvajanja u odnosu na pojedinačne parametre.

Pokazalo se da je POazna aktivnost bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, dok je DZOaza takođe bila nešto niža, ali razlika nije dostigla značajnost. U grupi pacijenata, uočene su značajne pozitivne korelacije POazne aktivnosti sa UH, LDL-H i HDL-H, a značajne negativne korelacije DZOazne aktivnosti sa SAA, MDA i PAB-om. Utvrđeno je da povećanje u koncentraciji SAA ima nezavistan uticaj na smanjenje DZOazne aktivnosti, kao i da visok procenat varijacije u DZOaznoj aktivnosti može da se objasni povećanjem koncentracije TOS-a, PAB-a i SAA.

Analiza parametara prema tokovima bolesti pokazala je značajno veći udeo LDL IVA i HDL 3a subfrakcija i značajno nižu koncentraciju HDL-H kod hronične sarkoidoze u odnosu na kontrolnu grupu. Trajanje terapije, kao i relativne proporcije HDL 3a i HDL 3c su bili značajno nezavisno povezani sa hroničnom sarkoidozom.

Relativni udeo HDL 3a subfrakcija, koncentracije PAB-a, LDL-H su bili značajno veći, dok su relativni udeo LDL IV, aktivnost DZOaze, koncentracija HDL-H, HDL dijametar bili značajno manji kod pacijenata sa izolovanom plućnom manifestacijom u odnosu na zdrave osobe. POaza je bila značajno niža kod pacijenata sa kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću u poređenju sa isključivo plućnom lokalizacijom. Izolovana plućna manifestacija se karakterisala značajnim korelacijama između relativnih udela HDL subfrakcija i parametara oksidativno-stresnog statusa, a utvrđeno je i da su koncentracija TOS-a i POazna aktivnost PON1 imali nezavistan uticaj na promene u distribuciji malih HDL čestica.

C. ZAKLJUČAK

Sarkoidoza je multisistemska, inflamatorna bolest koju karakteriše prisustvo granuloma sastavljenih od visoko-diferentovanih mononuklearnih fagocita i limfocita. Ove ćelije proizvode različite proinflamatorne medijatore koji dalje mogu da utiču na metabolizam lipida i oksidativno-stresni status. Dislipidemija, prisustvo malih LDL i HDL čestica i povišen oksidativni stres su dobro poznati faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB), ali je njihov značaj nedovoljno ispitan kod pacijenata sa sarkoidozom i samo se nekoliko studija bavilo ovom problematikom kod ovih pacijenata. Treba naglasiti da povezanost SAA, kao značajnog markera granulomatozne inflamacije, sa parametrima lipidnog i oksidativno-stresnog statusa još uvek nije dokumentovana u sarkoidozi. Takođe, u ovoj bolesti, status PON1 enzima nije utvrđen, a poznato je da i on može da se menja pod uticajem različitih inflamatornih i oksidativno-stresnih čimbenika. Pomenuti parametri mogu da se razlikuju između pacijenata sa različitim tokom, ili manifestacijom oboljenja, ali ni ove razlike još nisu istražene u sarkoidozi. Neke studije koje su ispitivale pacijente sa hroničnim inflamatornim oboljenjima utvrdile su da kod njih postoji povećan rizik za razvoj KVB.

Naši rezultati su pokazali da se pacijenti sa sarkoidozom nalaze u stanju inflamacije koje se karakteriše povećanim vrednostima SAA i hsCRP-a, povećanim nivoima markera oksidativnog stresa i sniženim vrednostima markera antioksidativne zaštite. U grupi pacijenata, ali ne i kod zdravih ispitanika, uočene su značajne korelacije između parametara inflamacije i oksidativnog stresa što ukazuje da inflamacija dovodi do povećanog oksidativnog stresa. Serumski i eritrocitni MDA su se izdvojili kao najbolji parametri u predviđanju prisustva bolesti kad se porede sa drugim parametrima oksidativno-stresnog statusa. Kako su procesi lipidne peroksidacije povezani sa stvaranjem fibroznog tkiva, a sarkoidoza je bolest u čijem krajnjem stadijumu se nalazi fibroza, time bi se mogao objasniti značaj određivanja MDA u sarkoidozi. U analizi dijagnostičke tačnosti parametara, modeli sačinjeni od kombinacije više oksidanasa i/ili antioksidanasa su imali bolji potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika u odnosu na pojedinačne parametre. Pacijenti se karakterišu dislipidemijom, koja se ogleda u značajno povećanim vrednostima UH, TG i sniženim vrednostima HDL-H uz predominaciju manjih HDL i LDL čestica. Dislipidemija može biti posledica udruženog delovanja inflamatornih i oksidativno-stresnih čimbenika. PON1 aktivnost je bila niža kod pacijenata, a utvrđeno je da su SAA i parametri oksidativnog stresa značajno nezavisno povezani sa DZOaznom aktivnošću PON1 i na ovaj način se dodatno potvrđuje uticaj inflamacije na karakteristike HDL čestica.

Ispitivani parametri inflamacije se ne razlikuju značajno između pacijenata sa različitim tokom/manifestacijama bolesti dok su se parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u akutnom i hroničnom toku bolesti razlikovali značajno samo u odnosu na kontrolnu grupu. U hroničnoj sarkoidozi, kao i kod pacijenata sa izolovanom plućnom manifestacijom bolesti dominiraju HDL čestice manje veličine. U izolovanoj plućnoj manifestaciji oboljenja utvrđena je značajna povezanost zastupljenosti malih HDL čestica sa parametrima oksidativno-stresnog statusa i POaze. Klinička manifestacija oboljenja nije značajno uticala na profil LDL subfrakcija.

Svi prethodno navedeni rezultati ukazuju na kompleksnu povezanost sarkoidoze i ateroskleroze i potrebu da se ova veza istraži dalje u većim, prospektivnim studijama kako bi se bi se potvrdilo postojanje faktora rizika i odredila prevalenca KVB u ovoj populaciji pacijenata.

D. OBJAVLJENI REZULTATI

RADOVI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. **Ivanišević J**, Kotur Stevuljević J, Stefanović A, Jelić Ivanović Z, Spasić S, Videnović Ivanov J, Vucinić Mihailović V, Ilić J. Dyslipidemia and oxidative stress in sarcoidosis patients. Clin Biochem 2012; 45: 677-82 (IF 2,450; rang časopisa M21 (8/32) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
2. **Ivanišević J**, Kotur Stevuljević J, Stefanović A, Spasić S, Vucinić Mihailović V, Videnović Ivanov J, Jelić Ivanović Z. Association of serum amyloid A and oxidative stress with paraoxonase 1 in sarcoidosis patients. Eur J Clin Invest 2016; 46: 418-24 (IF 2,687; rang časopisa M21 (27/151) u kategoriji Medicine, General and Internal)

OSTALI RADOVI:

3. Stanojković I, Kotur-Stevuljević J, Milenković B, Spasić S, Vujić T, Stefanović A, Ilić A, **Ivanisević J**. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. Resp Med 2011; 105: S31-S37 (IF 2,475; rang časopisa M22 (22/48) u kategoriji Respiratory System)
4. Matović V, Buha A, Bulat Z, Djukić-Cosić D, Miljković M, **Ivanisević J**, Kotur Stevuljević J. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. Food Chem Toxicol 2012; 50: 552

- 7 (IF 3,010; rang časopisa M21 (12/124) u kategoriji Food Science and Technology)
5. Djordjevic B, Baralic I, Kotur-Stevuljevic J, Stefanovic A, **Ivanisevic J**, Radivojevic N, Andjelkovic M, Dikic N. Effect of astaxanthin supplementation on muscle damage and oxidative stress markers in elite young soccer players. *J Sport Med Phys Fit* 2012; 52: 382-92 (IF 0,730; rang časopisa M23 (61/84) u kategoriji Sport Sciences)
 6. Šuvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic Radojevic A, Pljesa Ercegovac M, Matic M, Djukic T, Coric V, Jakovljevic J, **Ivanisevic J**, Pljesa S, Jelic-Ivanovic Z, Mimic-Oka J, Dimkovic N, Simic T. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 2013; 28: 202-12 (IF 2,450; rang časopisa M21 (8/32) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
 7. Peco-Antic A, Ivanisevic I, Vulicevic I, Kotur-Stevuljevic J, Ilic S, **Ivanisevic J**, Miljkovic M, Kocev N. Biomarkers of acute kidney injury in pediatric cardiac surgery. *Clin Biochem* 2013; 46: 1244-51 (IF 2,450; rang časopisa M21 (8/32) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
 8. Stojanov M, Stefanovic A, Dzingalasevic G, **Ivanisevic J**, Miljkovic M, Mandic Radic S, Prostran M. Total bilirubin in young men and women: Association with risk markers for cardiovascular diseases. *Clin Biochem* 2013; 46: 1516-9 (IF 2,450; rang časopisa M21 (8/32) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
 9. Stanojkovic I, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Milenkovic B, Vujic T, Stefanovic A, **Ivanisevic J**. Relationship between bone resorption, oxidative stress and inflammation in severe COPD exacerbation. *Clin Biochem* 2013; 46: 1678-82 (IF 2,450; rang časopisa M21 (8/32) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
 10. Vekic J, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Spasic S, Videnovic-Ivanov J, **Ivanisevic J**, Vucinic-Mihailovic V, Gojkovic T. Distribution of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein subclasses in patients with sarcoidosis. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1780-7 (IF 2,884; rang časopisa M21 (6/31) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
 11. Antunovic T, Stefanovic A, Ratkovic M, Gledovic-Barhanovic N, Bozovic D, **Ivanisevic J**, Prostran M, Stojanov M. High uric acid and low superoxide dismutase as possible predictors of all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2013; 45: 1111-9 (IF 1,293; rang časopisa M23 (55/77) u kategoriji Urology and Nephrology)

12. Petrovic S, Bogavac -Stanojevic N, Kotur- Stevuljevic J, Peco- Antic A, Ivanisevic I, **Ivanisevic J**, Paripovic D, Jelic- Ivanovic Z. Oxidative status parameters in children with urinary tract infection. *Biochem Medica* 2014; 24: 266-72(IF 2,667; rang časopisa M21 (7/30) u kategoriji Medical Laboratory Technology)
13. Kardum N, Konic- Ristic A, Savikin K, Spasic S, Stefanovic A, **Ivanisevic J**, Miljkovic M. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on antioxidant/pro-oxidant status in healthy subjects. *J Med Food* 2014; 17: 869-74 (IF 1,626; rang časopisa M22 (51/122) u kategoriji Food Science and Technology)
14. Vidovic B, Milovanovic S, Djordjevic B, Kotur- Stevuljevic J, Stefanovic A, **Ivanisevic J**, Miljkovic M, Spasic S, Stojanovic D, Pantovic M. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia. *Psychiat Danub* 2014; 26: 205-13 (IF 1,301; rang časopisa M23 (125/194) u kategoriji Psychiatry)
15. Vidovic B, Stefanovic A, Milovanovic S, Djordjevic B, Kotur-Stevuljevic J, **Ivanisevic J**, Miljkovic M, Spasic S. Associations of oxidative stress status parameters with traditional cardiovascular disease risk factors in patients with schizophrenia. *Scand J Clin Lab Inv* 2014; 74: 184-91 (IF 1,899; rang časopisa M23 (78/123) u kategoriji Medicine, Research and Experimental)
16. Crevar Sakač M, Vujić Z, Kotur Stevuljević J, **Ivanišević J**, Jelić Ivanović Z, Milenković M, Markelić M, Vujčić Z. Effects of atorvastatin and artichoke leaf tincture on oxidative stress in hypercholesterolemic rats. *Vojnosanit Pregl* 2016; 73: 178-87 (IF 0,355; rang časopisa M23 (133/151) u kategoriji Medicine, General and Internal)

E. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. U tezi su predstavljeni parametri inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa, njihova međusobna povezanost, kao i potencijal u razdvajanju pacijenata od zdravih ispitanika. Pomenuti parametri su prisutni u patogenezi oboljenja, a u ovom radu se sagledao njihov značaj. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M21.

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 "**Ispitivanje pokazatelja inflamacije, oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod pacijenata sa sarkoidozom**", kandidata diplomiranog farmaceuta Jasmine Ivanišević.

Beograd, 8.7.2016.

1. dr Zorana Jelić-Ivanović (mentor), redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. dr Jelena Kotur Stevuljević (mentor), vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. dr Aleksandra Stefanović, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. dr Jelena Vekić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

5. dr Violeta Vučinić Mihailović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
