

NAU NOM VE U MEDICINSKG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.11.2017. godine, broj 5940/13, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uloga kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre izazvane dijetom bogatom mastima kod miševa“

kandidata **dr Bojana Jorga evi a**, zaposlenog na Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Danijela Vu evi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tatjana Radosavljevi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Rada Ješi Vuki evi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Snežana Živan evi Simonovi , profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta u Beogradu slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Bojana Jorga evi a napisana je na ukupno 152 strane i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 9 tabela, 2 sheme, 12 grafikona i 1 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U uvodu, kandidat je definisao nealkoholnu masnu bolesti jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease /NAFLD/*) kao multisistemsku bolest koja pove ava rizik za nastanak i razvoj gojaznosti, hipertenzije, dislipidemije, insulinske rezistencije (IR) i dijabetesa melitusa (*diabetes*

mellitus) tip 2. Na adekvatan na in opisane su sve ključne patohistološke karakteristike ove bolesti, kao i sistemi za određivanje gradusa i stadijuma steatohepatitisa. Osim toga, opisane su ključne kliničke karakteristike, prirodni tok NAFLD, kao i dijagnostički parametri koji se uzimaju u obzir prilikom postavljanja dijagnoze ove bolesti. Uz to, prikazani su i epidemiološki podaci o NAFLD, pri čemu je posebno istaknuta visoka prevalencija ove bolesti. Pored toga, detaljno su opisani mehanizmi uključeni u nastanak, razvoj i progresiju NAFLD (IR, mehanizam akumulacije triglicerida (TG) u hepatocitima, lipotoksičnost /uloga masnih kiselina i ceramida/, oksidativni/nitrozativni stres i mitohondrijalna disfunkcija). Osim toga, opisana je uloga masnog tkiva, proinflamatornih citokina i adipokina u progresiji NAFLD. Posebno je istaknuta uloga endokanabinoidnog sistema (ES) u nastanku i razvoju NAFLD. Takođe, dat je prikaz eksperimentalnih modela NAFLD, kao i uticaj rimonabanta na patogenezu i progresiju NAFLD.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja uloge kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi NAFLD, sa posebnim osvrtom na ulogu u razvoju oksidativnog/nitrozativnog stresa, kapacitet antioksidativne zaštite, kao i koncentraciju oligoelemenata (Zn, Cu, Mn i Fe) u tkivu jetre. Pored toga, cilj je bio i da se ispita uticaj CB1 receptora na lipidni status, profil masnih kiselina u jetri (palmitinska, stearinska, oleinska, linoleinska i arahidonska kiselina), kao i adipokine (leptin, apelin, rezistin i visfatin u supkutanom i visceralnom masnom tkivu) i proinflamatorne citokine (IL-6 i IFN- γ) u masnom tkivu i jetri. Takođe, cilj je bio i da se ispita uticaj blokade CB1 receptora na glikemiju, koncentraciju insulina i HOMA indeks (HOMA, engl. *homeostatic model assessment*).

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da se radi o eksperimentalnoj studiji na mužjacima miševa C57BL/6 soja uzrasta 8 nedelja. Eksperimentalna animalna studija je sprovedena na Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu (MFUB). NAFLD je izazvana primenom dijeta koja je bogata mastima (HFD, engl. *high fat diet*). Uz to, detaljno je dat opis eksperimentalnog dizajna, kao i ura enih biohemijskih analiza (aktivnost aminotransferaza u serumu /AST i ALT/, parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa /MDA-malondialdehid, NO $_x$ -nitriti+nitrati/, antioksidativne zaštite /redukovani glutathion-GSH, ukupan SOD, mangan superoksid dismutaza-MnSOD, bakar/cink superoksid dismutaza-Cu/ZnSOD/, koncentracije Zn, Cu, Mn i Fe u tkivu jetre, lipidnog statusa /TG, ukupan holesterol-UH, HDL, LDL/, profila masnih kiselina u jetri /palmitinske, stearinske, oleinske, linoleinske i arahidonske kiseline/, adipokina /apelina, leptina, visfatina i rezistina u supkutanom i visceralnom masnom

tkivu/, proinflammatornih citokina /IL-6 i IFN- u oba masna tkiva i jetri/, kao i glikemije, insulinemije i HOMA indeksa). Sve eksperimentalne procedure su bile u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63/EU) i odobrene od strane Eti ke komisije MFUB (dozvola broj 476/1) 22. aprila 2016. godine.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni dobijeni rezultati svih gore navedenih ispitivanih parametara.

U **diskusiji** su svi dobijeni rezultati sveobuhvatno i kritički komentarisani, i upoređivani sa dosadašnjim saznanjima o mehanizmima nastanka i razvoja NAFLD. Rezultati su diskutovani u svetlu najnovijih činjenica o modulacijskoj ulozi kanabinoidnih CB1 receptora u regulaciji energetske homeostaze i patogenezi NAFLD.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata istraživanja, formulisani su **zaključci**, koji predstavljaju adekvatne odgovore na postavljene ciljeve istraživanja. U poglavlju **literatura** citirano je 413 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ove studije su pokazali da HFD dovodi do porasta aktivnosti AST i ALT u serumu. U obe grupe životinja koje su tretirane rimonabantom registrovano je značajno sniženje aktivnosti AST i ALT. Primena HFD dovela je do pojave difuzne steatoze sa portalnim inflamatornim infiltratom i fokalnim nekrotičnim promjenama u parenhimu. Nasuprot tome, životinje na HFD tretirane rimonabantom razvile su samo fokalnu steatozu.

Primena HFD dovela je do porasta koncentracija MDA i NOx u jetri. S druge strane, u poređenju sa miševima na HFD, rimonabant je indukovao smanjenje koncentracije MDA i NOx. Rimonabant je indukovao signifikantno smanjenje aktivnosti ukupne SOD u grupi miševa na HFD. Aktivnosti MnSOD i Cu/ZnSOD pratile su promene ukupne SOD. Uz to, u istoj grupi miševa uočeno je povećanje koncentracije GSH u poređenju sa miševima na HFD. Analiza sadržaja oligoelemenata u jetri pokazala je da je koncentracija Zn, Cu i Mn bila povišena u grupi miševa tretiranih sa HFD i rimonabantom u poređenju sa miševima na HFD. Nasuprot tome, ustanovljeno je da je rimonabant doveo do smanjenja koncentracije Fe u miševa na HFD.

Primena rimonabanta dovela je do porasta koncentracije UH i HDL u miševa na HFD. Sa druge strane, u ovoj grupi životinja zabeležena je značajno niža koncentracija LDL. Primena rimonabanta izazvala je sniženje proporcije palmitinske i oleinske kiseline u tkivu jetre u miševa

na HFD. Nasuprot tome, zna ajno pove anje proporcije linoleinske i arahidonske kiseline uo eno je u miševa na HFD tretiranih rimonabantom u odnosu na miševe koji su dobijali HFD.

Primena rimonabanta je dovela do sniženja koncentracije glukoze, insulina i HOMA indeksa u miševa na HFD. Uz to, rimonabant je doveo do sniženja koncentracije svih ispitivanih adipokina u potkožnom i visceralnom masnom tkivu. Dobijeni nalazi ukazuju da rimonabant ispoljava antiinflamacijsko dejstvo i poboljšava insulinsku senzitivnost.

Analiza koncentracije citokina u visceralnom i supkutanom masnom tkivu pokazala je da tretman rimonabantom zna ajno smanjenje koncentracije IL-6 i IFN- u oba masna tkiva u miševa na HFD. Sli no tome, u miševa na HFD tretiranih rimonabantom registrovan je zna ajni pad koncentracije ovih citokina u tkivu jetre, što ukazuje na antiinflamatorni efekat blokade CB1 receptora.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ovo je prva studija koja je ispitala efekte blokade CB1 receptora na oksidativno/nitrozativno ošte enje tkiva jetre, kao i na promene sadržaja oligoelemenata (Cu, Zn, Mn i Fe) koje nastaju u NAFLD. Rezultati ove studije pokazuju da endokanabinoidi pogoršavaju oksidativni/nitrozativni stres u NAFLD i doprinose razvoju nealkoholnog steatohepatitisa (NASH) posredstvom CB1 receptora. Naime, antioksidativno dejstvo rimonabanta potvr eno je smanjenjem lipidne peroksidacije u miševa na HFD tretiranih ovim antagonistom CB1 receptora. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima drugih istraživa a, koji su pokazali da u toku NAFLD koja je indukovana HFD dolazi do porasta nivoa anandamida i ushodnne regulacije CB1 receptora (*Vettor R i sar., 2009, Hussien NI i sar., 2017, de Azua IR i sar., 2017*). Rezultati ovih istraživanja ukazuju da tretman rimonabantom dovodi do zna ajnog smanjenja koncentracije NOx u miševa na HFD. Mogu e objašnjenje za ovakav rezultat odnosi se na antiinflamatorne i citoprotektivne efekte koji nastaju usled inhibicije ili genetske delecije (*Mukhopadhyay P i sar., 2010, Bermudez-Silva FH i sar., 2012, Romero-Zerbo SY i sar., 2014, Jorga evi B i sar., 2015, Polyzos SA i Mantzoros CS, 2016*). Ova studija pokazuje da se aktivnost obe izoforme SOD pove ala usled primene HFD. Sli no tome, publikovani podaci ukazuju da jetra u NAFLD koja je indukovana HFD, predstavlja organ sa najizrazitijim porastom aktivnosti SOD (*Aubert J i sar., 2011, Yuzefovych LV i sar., 2013, Romero-Zerbo SY i sar., 2014, Jorga evi B i sar., 2015, Polyzos SA i Mantzoros CS, 2016*).

U ovoj studiji uo en je zna ajan porast koncentracije TG, UH i njegove LDL frakcije u plazmi miševa koji su bili na HFD. Pored toga, pokazano je da je HFD dovela do zna ajnog smanjenja koncentracije HDL u grupi miševa na HFD. Ovi rezultati su u saglasnosti sa brojnim studijama koje ukazuju na povezanost dislipidemije i NAFLD (*Simonen P i sar., 2011, Enjoji M i sar., 2012, Fuchs CD i sar., 2014, Ioannou GN, 2016, Katski N i sar., 2016, Jorga evi B i sar., 2017*). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da primena rimonabanta kod miševa na HFD dovodi do zna ajnog smanjenja koncentracije UH i TG u plazmi. Tako e, uo eno je zna ajno smanjenje koncentracije LDL u plazmi miševa na HFD koji su tretirani rimonabantom. Sa druge strane, koncentracija HDL u plazmi bila je zna ajno povišena kod miševa treiranih HFD i rimonabantom. Sli no tome, rezultati drugih *in vivo* studija u kojima je koriš en rimonabant kod gojaznih osoba i dijabeti ara, ukazuju da blokada CB1 receptora u zna ajnoj meri modifikuje lipidni profil (*Vettor R i sar., 2009 i Després JP i sar., 2009 Cheung B i sar., 2013, Hussien NI i sar., 2017, de Azua IR i sar., 2017*).

U fokusu nedavnog nau nog istraživanja kandidata je po prvi put bilo ispitivanje efekata blokade CB1 kanabinoidnih receptora na hepati ki profil masnih kiselina u NAFLD koja je izazvana HFD (*Jorga evi B i sar., 2017*). Naime, ustanovljeno je zna ajno sniženje proporcije palmitinske i stearinske kiseline u jetri u obe rimonabantom tretirane grupe. Ovaj efekat rimonabanta bio je udružen sa smanjenjem intenziteta inflamacije. Ovakve promene su, prema podacima drugih autora, pra ene porastom koncentracije anandamida u cirkulaciji i pove anjem hepati ke ekspresije CB1 kanabinoidnih receptora u NAFLD izazvanoj HFD (*Vettor R i sar., 2009*). Uz to, uo eno je zna ajno smanjenje proporcije arahidonske kiseline u miševa na HFD. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima koji ukazuju da metaboli ki derivati ove kiseline, odnosno eikosanoidi, imaju sposobnost da naruše lipidnu homeostazu u jetri (*Neuschwander-Tetri BA i sar., 2010, Pinzani M i sar., 2011, Ress C i sar., 2016*). Nasuprot tome, primena rimonabanta dovela je do zna ajnog porasta proporcije arahidonske kiseline u jetri miševa na HFD nakon administracije rimonabanta.

Shodno rezultatima ove studije, zna ajan porast koncentracije apelina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u miševa na HFD je kompatibilan sa podacima iz literature, koji ukazuju da apelin svojim inflamacijskim efektom uti e na metabolizam lipida i glukoze (*Chapman NA i sar., 2014, Angrish MM i sar., 2016*). Ovom studijom je pokazano da HFD dovodi do zna ajnog porasta koncentracije leptina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu,

što je u saglasnosti sa podacima iz literature (*Jung UJ i sar., 2014, Povero D i Feldstei AE, 2016*). Tako e, ustanovljeno je da blokada CB1 receptora normalizuje koli inu supkutanog i visceralnog masnog tkiva u miševa na HFD tretiranih rimonabantom. Pored toga, na eno je zna ajno smanjenje koncentracije visfatina u oba masna tkiva miševa na HFD tretiranih rimonabantom, što je u saglasnosti sa publikovanim podacima, koji potvr uju da aktivacija CB1 receptora stimuliše deponovanje masti u adipocitima (*Jamali R i sar., 2016*). Ovom studijom je pokazano i da rezistin u zna ajnoj meri doprinosi nastanku inflamacije i IR u miševa na HFD. Ovakav nalaz je u korelaciji sa nedavno publikovanim podacima (*Al-Muzafar HM i sar., 2017*).

Rezultati ove studije ukazuju da rimonabant izaziva signifikantno sniženje koncentracije IL-6 i IFN- u supkutanom i visceralnom masnom tkivu miševa na HFD. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa antiinflamatornim i citoprotektivnim efektima rimonabanta (*Nam DH i sar., 2012, Romero-Zerbo SY i sar., 2014, Al-Muzafar HM i sar., 2017, Hussien NI i sar., 2017, de Azua IR i sar., 2017*).

Ovom studijom je uo en porast nivoa IL-6 i IFN- u jetri, koji nastaje kao posledica primene HFD. Dobijeni nalaz je u saglasnosti sa objavljenim podacima koji ukazuju da je inflamacijsko ošte enje hepatocita klju na karakteristika progresije jednostavne steatoze u teže oblike bolesti (*Fraulob JC i sar., 2010, Aubert J i sar., 2011, Rolo AP i sar., 2012, Hussien NI i sar., 2017, de Azua IR i sar., 2017*). Tako e, ustanovljeno je da rimonabant dovodi do zna ajnog smanjenja vrednosti IL-6 i IFN- u tkivu jetre u miševa na HFD. Do sli nih rezultata došli su i drugi istraživa i koji su utvrdili da rimonabant kod životinja na HFD dovodi do smanjenja hepato kog sadržaja anandamida, kao i smanjenja gustine CB1 receptora u parenhimu jetre (*Osei-Hyiaman D i sar., 2005, Hussien NI i sar., 2017, De Azua IR i sar., 2017*).

Ovom studijom je utvr eno da inhibicija CB1 kanabinoidnih receptora posledi no izaziva smanjenje glikemije, insulinemije i HOMA indeksa u miševa na HFD (*Lindborg KA i sar., 2010, Inzucchi SE, 2015, Hazlehurst JM i sar., 2016*). Ovi rezultati su u saglasnosti sa brojnim eksperimentalnim i klini kim studijama koje potvr uju povezanost NAFLD i razli itih komponenti metaboli kog sindroma (abdominalni tip gojaznosti, IR, aterogena dislipidemija i dr.) (*Byrne CD i sar., 2015, Polyzos SA i sar., 2016, Katski N i sar., 2016, Hazlehurst JM i sar., 2016*).

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

1. **Jorga evi B**, Mladenovi D, Ninkovi M, Veskovi M, Dragutinovi V, Vatazevi A, Vu evi D, Ješi Vuki evi R, Radosavljevi T. Rimonabant improves oxidative/nitrosative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Long* 2015; DOI: 10.1155/2015/842108 (M21, IF 4.492)
2. **Jorga evi B**, Vu evi D, uri i I, Šobaji S, Mladenovi D, Veskovi M, Ješi Vuki evi R, Radosavljevi T. The effect of cannabinoid receptor 1 blockade on hepatic free fatty acid profile in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Chem Phys Lipid* 2017;204:85-93. (M22, IF 3.361)

E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Uloga kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre izazvane dijatom bogatom mastima kod miševa**“ kandidata **dr Bojana Jorga evi a**, predstavlja sveobuhvatan, originalan nau noistraživa ki rad, koji je ura en po svim principima metodologije nau nog istraživanja. Ovu disertaciju odlikuju jasno definisani ciljevi, temeljan nau ni pristup, savremena metodologija rada, detaljno prikazani i diskutovani rezultati, kao i jasno definisani zaključci.

Patogeneza NAFLD i mehanizmi progresije steatoze u teže oblike bolesti još uvek nisu u potpunosti poznati. Ova tema postaje sve zna ajnija, s obzirom da incidencija gojaznosti i oboljenja udruženih sa metaboli kim sindromom zadobija pandemijski karakter. Stoga, ovo istraživanje doprinosi rasvetljavanju nepoznanica vezanih za modulacijsku ulogu endokanabinoida i CB1 receptora, kako u regulaciji energetske homeostaze, tako i u patogenezi NAFLD i njenoj progresiji u teže oblike bolesti.

Rezultati sprovedenog istraživanja doprinose usmeravanju dosadašnjih nedovoljno efikasnih terapijskih procedura u pravcu uspešnijeg i ciljanog le enja ove bolesti. Uz to, bolje razumevanje i preciznije sagledavanje uloge endokanabinoida i CB1 receptora u patogenezi i progresiji NAFLD koji proisti u iz ove doktorske disertacije (zna ajno smanjenje oksidativnog/nitrozativnog ošte enja tkiva jetre, modulacija lipidnog statusa i profila masnih kiselina u jetri, pozitivna modulacija insulin-zavisnog preuzimanja glukoze i poboljšanje patohistoloških promena u jetri) bi omogućilo njenu efikasniju prevenciju, i samim tim produženje životnog veka.

Na osnovu svega navedenog, imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, i ocenjuju i zna aj sprovedenog istraživanja, ciljeve, primenjenu metodologiju rada i potencijalnu prakti nu primenu rezultata, Komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju **dr Bojana Jorga evi a** i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 04.12.2017.

lanovi Komisije:

Prof. dr Tatjana Radosavljevi

Prof. dr Rada Ješi Vuki evi

Prof. dr Snežana Živan evi Simonovi

Mentor:

Prof. dr Danijela Vu evi
