

Medicinski fakultet
Univerzitet u Ni-u
Nau no-nastavnom ve u
Odboru za doktorske disertacije

Predmet:

Izve-taj komisije o izra enoj doktorskoj disertaciji Gordane Petrovi , spec. dr med.

Odlukom Nau no-nastavnog ve a Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Ni-u broj: 06-KM-66/08 od 29.10.2015. godine prihva en je izve-taj mentora prof. dr Gorana Bjelakovi a o izradjenoj doktorskoj disertaciji Gordane Petrovi , spec. dr med., studenta DAS-klini ka medicina iz Ni-a, pod odobrenim naslovom "Klini ko-biohemijske karakteristike nealkoholne masne bolesti jetre kao manifestacije metaboli kog sindroma".

U napred navedenoj odluci Nau no-nastavnog ve a Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Ni-u, imenovani su članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije u sastavu:

Prof. dr Aleksandar Nagorni, predsednik
Prof. dr Goran Bjelakovi , mentor i član
Prof. dr Dragan Mihailovi , član
Prof. dr Tatjana Jevtovi -Stoimenov, član
Prof. dr Petar Svorcan, član sa Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Nakon detaljnog pregleda doktorske disertacije komisija podnosi slede i:

IZVEŠTAJ

I. Opšti podaci

Tema za izradu doktorske disertacije kandidata dr Gordane Petrovi je odobrena odlukom Nau no-nastavnog ve a Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Ni-u, NSV broj: 8/19-01-004/12-023, na sednici 25.06.2012. godine u Ni-u. Kandidat dr Gordana Petrovi obavila je svoje istraflivanje na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Klini kog centra u Ni-u, Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Ni-u, Institutu za patologiju Klini kog centra u Ni-u i u Laboratoriji za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, u periodu od januara 2012. do oktobra 2014. godine.

II. Odnos urađene disertacije prema prijavi i odobrenju teme

Doktorska disertacija o kliničko-biohemijske karakteristike nealkoholne masne bolesti jetre kao manifestacije metaboličkog sindroma, predstavlja originalan i samostalan naučno-istraživački rad iz oblasti gastroenterologije i hepatologije, sa jasno postavljenim ciljevima koji su u skladu sa zadatom temom i primenom savremene metodologije koja je detaljno objašnjena. Naslov doktorske disertacije u potpunosti je saglasan sa sadržajem sprovedenog istraživanja. Postavljeni ciljevi istraživanja i metodologija su ostali nepromenjeni tokom celog istraživanja.

III. Tehnički opis disertacije

Doktorska disertacija sadrži sve predviđene delove i pisana je u skladu sa principima naučno-istraživačkog rada.

Doktorska disertacija je napisana na 175 strana i sastoji se iz devet poglavlja: uvod, pregled literature, naučna hipoteza, ciljevi istraživanja, pacijenti i metode rada, rezultati, diskusija, zaključak i literatura.

IV. Sadržajna struktura doktorske disertacije.

U uvodnom poglavlju **Pregled literature** navedena su dosadnja saznanja vezana za temu doktorske disertacije. Na početku, data je definicija i podjela nealkoholne masne bolesti jetre, sa osvrtom na epidemiologiju bolesti. U delu koji govori o etiologiji NAFLD, posebno su analizirani najvažniji primarni faktori rizika za razvoj NAFLD (gojaznost, DM tip 2, dislipidemija i metabolički sindrom). Ukazano je naročito na značaj metaboličkog sindroma za razvoj NAFLD, navedene su dve najčešće definicije metaboličkog sindroma, najvažniji faktori rizika i značaj insulinske rezistencije u patogenezi ova dva entiteta. Zatim je objašnjena patogeneza NAFLD kroz teoriju štetnog udarca i posebno su analizirana sva patogenetska dejavanja na putu razvoja steatoze jetre i steatohepatitisa. Imaju i u vidu etničke i interindividualne sklonosti u obolevanju od NAFLD, poseban osvrt je napravljen na značaj genskog polimorfizma Patatin-like phospholipase domain containing-3 gena (PNPLA3) u sklonosti ka razvoju NAFLD i uticaju na stepen histoloških promena.

U celini kliničke manifestacije i laboratorijski nalazi navedeni su literaturni podaci koji govore da je NAFLD asimptomatska bolest i da se uglavnom otkriva slučajno tokom rutinskih laboratorijskih analiza krvi, kada se otkriju povišene vrednosti aminotransferaza ili se ultrazvukom pregledom otkrije masna jetra. Laboratorijski testovi koji se rutinski rade u cilju evaluacije pacijenata sumnjivih na NAFLD uključuju određivanje jetrih enzima u krvi. Imaju i u vidu da više od 80% pacijenata imaju normalne vrednosti transaminaza, koje mogu ostati nepromenjenih vrednosti u toku progresije bolesti, u delu poglavlja koje govori o dijagnozi bolesti

posebno su naglašeni podaci iz radova stranih autora koji se odnose na senzitivnost i specifičnost ostalih dijagnostičkih metoda kao što su: ultrazvuk, kompjuterizovana tomografija,

magnetna rezonanca, tranzijentna elastografija i biopsija jetre. Istaknuto je da se poslednjih godina posebna pažnja poklanja istraživanju i nalaganju neinvazivnih biomarkera NAFLD koji bi se koristili u skriningu populacije, stepenovanju bolesti, praćenju progresije bolesti i efekta terapije. U tu svrhu analizirane su dijagnostičke mogućiosti imunoenzimskih testova za merenje plazmatski nivoa citokeratina-18, jer je to biomarker koji najviše obećava u neinvazivnoj dijagnostici NAFLD i NASH. Tako je opisane su patohistološke karakteristike NAFLD i NASH.

U završnom delu ovog poglavlja razmatraju se literaturni podaci o prirodnom toku bolesti, prognozi i terapiji NAFLD.

Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi kliničke i biohemijske karakteristike nealkoholnog masnog oboljenja jetre, kao i njegovih podkategorija uključujući i masnu jetru i nealkoholni steatohepatitis.
2. Utvrditi glavne rizikne faktore za nastanak NAFLD.
3. Utvrditi povezanost metaboličkog sindroma i NAFLD
4. Utvrditi značaj neinvazivnih biomarkera i procedura (biohemijskih analiza krvi, ultrasonografije) u postavljanju dijagnoze nealkoholnog masnog oboljenja jetre, kao i u klasifikaciji NAFLD na podtipove.
5. Utvrditi značaj određivanja plazmatskog citokeratina-18 u postavljanju dijagnoze NAFLD.
6. Utvrditi udruženost polimorfizma I148M PNPLA3 gena sa biohemijskim parametrima NAFLD, kao i sa histološkim parametrima aktivnosti bolesti.
7. Ispitati udruženost polimorfizma I148M PNPLA3 gena sa metaboličkim sindromom i korelirati sa vrednostima citokeratina-18 u plazmi.

U poglavlju **Pacijenti i metode** jasno su prikazane grupe pacijenata, primenjene dijagnostičke procedure i korišćene statističke analize. Odabir pacijenata i metoda ispitivanja izvršen je na korektan i stručan način uz poštovanje svih elemenata naučno istraživačkog rada. Istraživanje predstavlja prospektivnu kliničku studiju koja je obuhvatila 55 pacijenata, kod kojih je na osnovu anamnestičkih podataka, fizikalnog pregleda, biohemijskih analiza krvi, antropometrijskih merenja i ultrazvučnog pregleda abdomena postavljena dijagnoza nealkoholne masne bolesti jetre i metaboličkog sindroma.

Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije podrazumevali su: konzumiranje alkohola (više od 21 alkoholno piće nedeljno za muškarce i više od 14 pića nedeljno za žene unazad dve godine); upotrebu hepatotoksičnih lekova (kortikosteroidi, imunosupresivi, amiodaron); dijagnostikovane metaboličke i genetske bolesti jetre (Wilsonova bolest, hemohromatoza, 1 antitripsin deficijencija); akutni i hronični virusni hepatitis (hepatitis B i hepatitis C); autoimune bolesti jetre (primarna bilijarna ciroza, primarni sklerozirajući i holangitis, autoimuni hepatitis).

Kontrolnu grupu sačinjavao je 31 zdrav ispitanik.

Pacijentima je uzimana detaljna anamneza o ranijem i sadašnjem konzumiranju alkohola, upotrebi hepatotoksičnih lekova, prisutnim komorbiditetima (hipertenzija, dijabetes, gojaznost,

dislipidemija) i ranijim bolestima jetre (preleflanim virusnim hepatitisima, eventualnim metaboli kim, autoimunim, naslednim bolestima jetre).

Obavljen je fizikalni pregled, merene su i belefene vrednosti krvnog pritiska i izvr-ena su antropometrijska merenja, koja su podrazumevala merenje telesne visine, telesne tefline i obima struka i izra unavanje indeksa telesne mase. U laboratorijskim analizama krvi ra ena je kompletna krvna slika, C reaktivni protein, aktivnost aminotferaza, ALP, GGT, vrednosti ukupnog i direktnog bilirubina, urata, feritina, ceruloplazmina, gvofl a, glikemije na-te, insulina na-te, vrednosti ukupnog holesterola , HDL holesterola, LDL holesterola, triglicerida, ukupnih proteina i albumina, faktora koagulacije (PT, INR, parcijalno tromboplastinsko vreme i fibrinogen). Utvr en je odnos AST/ALT.

Merenje insulinske rezistencije izvr-eno je kori- enjem HOMA indeksa (Homeostasis model Assessment). Vrednost NAFLD fibroznog skora (prediktivnog panela fibroze), izra unavana je kori- em 6 varijabli (godine, BMI, trombociti, glikemija na-te/dijabetes, AST/ALT odnos) povezanih u matemati ku formulu.

Prisustvo metaboli kog sindroma i njegovih komponenti analizirano je kod svakog bolesnika koriste i NCEP/ATPIII kriterijume.

Ultrazvu ni pregled jetre izvo en je u Kabinetu za ultrazvuk, Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju, KC Ni-. Kori- en je aparat ACUSION Simens model X 300 i ultrazvu na sonda od 3,5 MHz. Steatoza jetre ocenjena ultrazvukom podeljena je u tri stepena zavisno od tefline UZ promena.

Pacijentima kod kojih je na osnovu anamnesti kih podataka, biohemijskih analiza krvi (povi-ene aminotferaze u vremenskom periodu duflem od 6 meseci) i ultrazvu nog pregleda postavljena sumnja na nealkoholni steatohepatitis ra ena je biopsija jetre, kod njih 16. Biopsija jetre je ra ena standardnim interkostalnim, srednjim aksilarnim pristupom, nakon osmo asovnog gladovanja. Pre intervencije aplikovan je subkutano lokalni anestetik lidocain hlorid u podru je biopsije, uz ultrazvu ni prikaz istog podru ja. Biopsija je ra ena iglom Menghini.

Patohistolo-ka obrada uzoraka tkiva jetre dobijenog u toku biopsije, analiza i opis preparata, ra ena je u Institutu za patologiju Klini kog centra Ni-. Patohistolo-ka analiza je koriste i sistem stadiranja patohistolo-kih promena prema Brunt i sar. podrazumevala: postavljanje dijagnoze nealkoholne masne jetre; odre ivanje stepena steatoze; postavljanje dijagnoze NASH prema minimalnim kriterijumima (steatoza, lobularna upala, baloniranje hepatocita); stadiranje nekroinflamatorne aktivnosti I odre ivanje stadijuma fibroze.

Merenje koncentracije citokeratina-18 u krvnoj plazmi pacijenata izvr-eno je imunoenzimskim testom ó ELISA na Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Ni-u po uputstvu proizvo a a.

Za molekularnu dijagnostiku u cilju genotipizacije odnosno utvr ivanja genskog polimorfizma PNPLA3 I148M gena lan anom reakcijom polimeraze (PCR) izvr-eno je uzorakovanje krvi od 5ml u vakuum epruveti sa dodatkom EDTA. Uzorak je zamrznut na -20°C. Za detekciju polimorfizma PNPLA3 rs738409 (C10109G) koristili smo molekularnu PCR-RFLP metodu koja je bazirana na umnoflavanju dela genoma koji kodira sintezu proteina BCSP-31. O ekivana veli ina produkta umnoflavanja iznosi 333 bp (baznih parova). Veli ina produkta PCR

reakcije od 333 bp dokazana je pomoć u uređaju za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, Njemačka) sa kompjuterskim programom QIAxcel BioCalculator.

Kontinualni parametri predstavljeni su srednjim vrednostima, standardnim devijacijama i medijanama. Atributivni parametri predstavljeni su u postotcima i procentima. Normalnost raspodele kontinualnih varijabli ispitivana je Shapiro-Wilk ili Kolmogorov-Smirnov testom u zavisnosti od veličine ispitivanih grupa ispitanika. Upoređivanje vrednosti kontinualnih parametara između dva nezavisna uzorka vršeno je Mann-Whitney i Studentovim t-testom, a poređenje 3 nezavisna uzorka Kruskal-Wallis testom ili ANOVOM (u zavisnosti od normalnosti raspodele poređenih varijabli). U zavisnosti od normalnosti raspodele utvrđivanje povezanosti kontinualnih varijabli utvrđivano je Pearsonovim (r) ili Spearmanovim (ρ) koeficijentom linearne korelacije. Pearsonovim χ^2 testom, a po potrebi, u slučaju tabele kontigencije 2×2, korišćen je Mantel-Haenszelov ili Fisherov test ta ne verovatno je za poređenje u postotcima i raspodele modaliteta atributivnih parametara. Utvrđivanje prediktabilnosti nezavisnih parametara na zavisne dihotomne parametre utvrđivano je univarijantnom logističkom regresionom analizom. Statistička obrada podataka obavljena je programom SPSS 15.0, a kao minimalna statistička značajna vrednost korišćena je $p < 0,05$.

Rezultati istraživanja prikazani su tabelarno i grafički. Rezultati su statistički obrađeni i sistematizovani po redosledu postavljenih ciljeva i zadataka istraživanja. Dobijeni rezultati potvrdili su hipotezu i ciljeve istraživanja.

Dobijeni rezultati su pokazali da pacijenti sa NAFLD statistički imaju signifikantno viši indeks telesne mase (engl. body mass index- BMI), obim struka (OS), sistolni (SKP) i dijastolni krvni pritisak (DKP), serumski nivo aminotransferaza, GGT ($p < 0,001$), LDL holesterola ($p < 0,05$), ukupnog holesterola ($p < 0,01$), triglicerida, urata, CRP, feritina, fibrinogena, glikemije na-te, insulina i HOMA-IR ($p < 0,001$), dok je vrednost HDL holesterola viša u kontrolnoj grupi ($p < 0,05$).

Utvrđeno je da pacijenti sa NAFLD imaju zastupljeniju hipertenziju (72,73% vs. 12,90%), DM tip 2 (47,27%), metabolički sindrom (87,27% vs. 9,68%), gojaznost (69,09%), kao i prvi, drugi i treći stepen gojaznosti u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Univarijantna logistička regresiona analiza je kao statistički značajne parametre od interesa za nastanak NAFLD potvrdila: glikemiju na-te, insulin na-te, HOMA-IR, urate, triglicidglicerol, AST, ALT, GGT, CRP, feritin, fibrinogen, telesnu težinu, MS, broj komponenata MS, SKP, DKP, hipertenziju ($p < 0,001$), holesterol, ALP, obim struka ($p < 0,01$), bilirubin, HDL holesterol i LDL holesterol ($p < 0,05$).

Najveći broj pacijenata NAFLD grupe, 23 (41,82%), je imao ultrazvučni (UZ) nalaz masne jetre III stepena, 20 (36,36%) sa II stepenom i 12 (21,82%) sa I stepenom. Kruskal-Wallis test i ANOVA analiza pokazali su da postoje statistički značajne razlike između grupa sa različitim ultrazvučnim stepenom masne jetre za insulin, LDL holesterol, OS, BMI ($p < 0,05$), kao i HOMA-IR i telesnu težinu (TT) ($p < 0,01$). Metabolički sindrom je statistički bio zastupljeniji u ispitanika UZ nalazom masne jetre II i III stepena ($p < 0,01$) u odnosu na UZ nalaz masne jetre I

stepena, kao i gojaznost, hipertenzija i DM tip 2 ($p < 0.05$). Multivarijantna logisti ka regresiona analiza je kao najvafnije prediktore razvoja II I III stepena masne jetre izdvojila: telesnu tefinu, hipertenziju i snifen serumski nivo HDL holesterola.

Visok rezultat NAFLD fibroznog skora ($> 0,675$) koji ukazuje na postojanje uznapredovale fibroze jetre utvr en je kod 10,91% pacijenta, dok je 50,91% pacijenata imalo NAFLD fibrozni skor $<$ od -1,45 –to isklju uje uznapredovalu fibrozu. Pacijenti kod kojih je rezultat NAFLD fibroznog skora ukazao na prisustvo uznapredovale fibroze su bili stariji ($p < 0,001$), statisti ki signifikantno su imali zastupljeniji DM tip 2, hipertenziju, gojaznost ($p < 0,05$), kao i odnos AST/ALT ve i od 1 ($p < 0,01$) u odnosu na pacijente sa NAFLD fibroznim skorom $<$ od -1,45.

Srednje vrednosti citokeratina-18 u plazmi kod pacijenata NAFLD grupe bile su statisti ki zna ajno vi-e u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Najvi-a srednja vrednost CK-18 u plazmi utvr ena je kod pacijenata sa NASH i ona je statisti ki bila vi-a u odnosu na grupu pacijenta sa obi nom steatozom ($p < 0,05$). Kruskal Wallis testom utvr ena je statisti ki zna ajna povezanost stepena intralobularne inflamacije i balonizacije hepatocita i serumskih nivoa CK-18 ($p < 0,05$). Koncentracija CK-18 u plazmi statisti ki je bila signifikantno vi-a kod pacijenata sa NASH i fibrozom drugog stadijuma u odnosu na pacijente kod kojih nije utvr eno prisustvo fibroze ($p < 0,05$).

Zastupljenost PNPLA3 rs738409 genotipova, CC, CG i GG u kontrolnoj grupi iznosila je 32,26%, 29,03% i 38,71%, dok je kod pacijenata sa NAFLD zastupljenost genotipova bila 26,74%, 29,07% i 44,19%. Pacijenti sa polimorfnim genom (GG) imali su statisti ki signifikantno vi-e srednje vrednosti nivoa AST i ALT u odnosu na nosioce normalnog alela, odnosno CC homozigote ($p < 0,05$). Nisu utvr ene statisti ki zna ajne razlike izme u genotipova pacijenata sa NAFLD u odnosu na starost, pol,BMI, prisustvo dijabetesa, hipertenzije, metaboli kog sindroma, povi-enih novoa triglicerida, ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola, glikemijom na-te i HOMA-IR. Najve i broj pacijenata kod kojih je ra ena biopsija jetre, njih 15 su bili nosioci G alela, odnosno 10 pacijenata su bili GG homozigoti, 5 pacijenata su bili CG heterozigoti i 1 pacijent normalan homozigot CC.

U poglavlju "**Diskusija**" detaljno i sistemati no su razmotreni dobijeni rezultati po postavljenim zadacima disertacije i upore eni sa odgovaraju im podacima iz literature. Klju ni elementi diskusije pokazuju da dobijeni rezultati u velikoj meri koreliraju sa aktuelnim svetskim saop-tenjima iz ispitivane oblasti, ali ima i opre nih nalaza.

U poglavlju "**Zaključci**" koncizno su navedeni zaklju ci istraffivanja, koji su u skladu sa postavljenom hipotezom, ciljevima i zadacima istraffivanja. Zaklju ak disertacije je nau no zasnovan i validan. Na osnovu dobijenih rezultata u na-em istraffivanju zaklju ujemo:

1. Nealkoholna masna bolest jetre je hepata na manifestacija metaboli kog sindroma. Metaboli ki sindrom ima 87,27 % pacijenata sa NAFLD, 50% sa NAFL i 91,67% sa NASH. Svi pacijenti imaju jedan ili vi-e metaboli kih rizi nih faktora, a 29,09% ima svih 5 rizi nih faktora. Metaboli ki sindrom i sve komponente MS su statisti ki

signifikantno zastupljenije kod pacijenata sa NAFLD i NASH kao podkategorijom bolesti u odnosu na kontrolnu grupu.

2. Metabolički sindrom i svaka komponenta MS pojedinačno, statistički značajno povećavaju verovatnoću pojave NAFLD: jedna hipertenzija i/ili povišen sistolni krvni pritisak $\times 130$ mmHg i/ili dijastolni pritisak $\times 85$ mmHg za 24,44 puta, prisutan DM tip 2 ili povišena glikemija na te $\times 5,6$ mmol/l 11,62 puta, povišen nivo triglicerida $\times 1,7$ mmol/l ili već tretirana abnormalnost 9,85 puta, snižen nivo HDL holesterola ili već tretirana abnormalnost za 3,78 puta. Porast broja metaboličkih komponenti za 1, statistički značajno poveća verovatnoću da će se do pojave NAFLD za 8,58 puta.
3. Pacijenti sa NAFLD i metaboličkim sindromom imaju statistički značajno viši nivo glikemije na te, insulina, insulinske rezistencije, zastupljeniju hipertenziju, gojaznost i DM tip 2 u odnosu na pacijente sa NAFLD bez metaboličkog sindroma, odnosno sve faktore rizika progresije bolesti. Prevalenca metaboličkog sindroma kod pacijenata sa NAFLD raste sa porastom indeksa telesne mase. Biopsiju jetre treba razmotriti kod pacijenata sa MS i ultrazvukom nalazom masne jetre.
4. Patogeneza NAFLD nije do kraja razjašnjena i insulinska rezistencija se smatra osnovnim patogenetskim mehanizmom razvoja i progresije bolesti. Pacijenti sa NAFLD (NAFL i NASH) imaju statistički značajno viši nivo insulina i insulinske rezistencije izražene kao HOMA-IR u odnosu na kontrolnu grupu, kao i pacijenti sa NASH u odnosu na pacijente sa običnom steatozom jetre, zbog čega možemo zaključiti da je insulinska rezistencija značajan prediktor pojave i progresije NAFLD. Porast HOMA-IR za jednu mernu jedinicu poveća verovatnoću pojave NAFLD za 3,55 puta.
5. Dislipidemija je značajan faktor rizika pojave NAFLD. Pacijenti sa NAFLD/NASH imaju statistički značajno viši nivo holesterola, LDL holesterola, triglicerida, dok je nivo HDL holesterola statistički značajno viši u kontrolnoj grupi. Porast nivoa triglicerida za jednu jedinicu mere poveća verovatnoću pojave NAFLD 16,02 puta, HDL za 87% i LDL holesterol za 85%, dok povećanje HDL holesterola za jednu mernu jedinicu smanjuje verovatnoću pojave NAFLD za 87%.
6. Pacijenti sa NAFLD (NAFL i NASH) imaju statistički značajno veći indeks telesne mase i obim struka, kao mere centralne gojaznosti, u odnosu na kontrolnu grupu. Indeks telesne mase i OS su parametri koje možemo lako izmeriti i predstavljaju važan antropometrijski indikator za skrining populacije sa visokim rizikom razvoja NAFLD i progresije bolesti.
7. Pacijenti sa NAFLD i NASH imaju statistički značajno zastupljeniju gojaznost, DM tip 2, hipertenziju i značajno viši nivo sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska u odnosu na kontrolnu grupu.
8. Pacijenti sa DM tip 2 i NAFLD su stariji, imaju statistički značajno viši nivo glikemije na te, odnosa AST/ALT, zastupljenost hipertenzije, metaboličkog sindroma i gojaznosti prvog, drugog i trećeg stepena kao jedinstvene kategorije gojaznosti u odnosu na pacijente sa NAFLD bez dijabetesa, odnosno sve faktore rizika razvoja uznapredovale

fibroze. Biopsiju jetre treba razmotriti kod pacijenata sa već dijagnostikovanim DM tip 2 i ultrazvukom nalazom masne jetre.

9. Kao i kod drugih bolesti jetre, jetrini biokemijski testovi su najčešće korišćeni markeri prisutnog oštećenja jetre. U našem istraživanju aktivnost enzima ALT je bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu, kao i GGT, AST i ALP. Nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti aminotransferaza između pacijenata sa običnom steatozom jetre i NASH, zbog čega se postavlja pitanje opravdanosti upotrebe aminotransferaza kao kriterijuma selekcije pacijenata za biopsiju jetre. Pacijenti sa NAFLD imali su statistički značajno više vrednosti CRP, feritina, urata, fibrinogena i bilirubina u odnosu na kontrolnu grupu.
10. Upotreba neinvazivnih skorova, kao što je NAFLD fibrozni skor, u kliničkoj praksi i svakodnevnom radu je korisna u selekciji pacijenata sa suptilnom uznapredovalom fibrozom i potrebom za biopsijom jetre.
11. Ultrazvuk je jeftina i dostupna dijagnostička metoda, zbog čega je tehnika izbora za skrining pacijenata na razvoj NAFLD naročito kod pacijenata sa multiplim rizicima.
12. Pacijenti sa NAFLD imaju statistički značajno više srednje vrednosti CK-18 u plazmi u odnosu na kontrolnu grupu. Unutar NAFLD spektra, najvišu srednju vrednost CK-18 u plazmi imaju pacijenti sa NASH i ona je statistički značajno viša u odnosu na grupu pacijenata sa običnom steatozom.
13. Imunoenzimski test za kvantitativno merenje nivoa CK-18 u plazmi može imati potencijalnu kliničku korist za pacijente sa NAFLD i multiplim rizicima (metabolički sindrom, gojaznost, dijabetes, hipertenzija) u neinvazivnoj dijagnostici NASH i fibroze, ali je potrebna dalja validacija imunoenzimskog testa na većem broju biopsiranih pacijenata.
14. PNPLA3 I148M polimorfizam je češći i kod pacijenata sa NAFLD u odnosu na kontrolnu grupu. Pacijenti sa NAFLD, homozigoti za polimorfni G alel imaju statistički značajno višu aktivnost AST i ALT, kao najosetljivijih markera oštećenja hepatocita, u odnosu na nosioce normalnog alela, odnosno CC homozigote, što ukazuje da je PNPLA3 I148M polimorfizam predisponirajući faktor razvoja NAFLD kod pacijenata sa rizicima.
15. Nije utvrđena udruženost I148M varijante PNPLA3 gena sa BMI, dijabetes melitusom, hipertenzijom, metaboličkim sindromom, povišenim serumskim nivoom triglicerida, ukupnog holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola, glikemijom na te i HOMA-IR, odnosno rizicima za NAFLD, što objašnjava interindividulane razlike u sklonosti ka bolesti.
16. Evidentna je udruženost G alela sa stepenom histoloških promena kod pacijenata sa NAFLD, međutim zbog malog broja pacijenata kod kojih je rađena biopsija jetre, nije utvrđena statistički značajna uticaj polimorfnog G alela na stepen histoloških promena, zbog čega su potrebna dalja istraživanja na većem broju pacijenata podvrgnutih biopsiji i patohistološkoj analizi.

ZAKLJUČAK:

Doktorska disertacija je uspešno realizovana u skladu sa postavljenim ciljevima istraflivanja. Dobijeni rezultati su pregledno prikazani tako da daju odgovore na postavljene ciljeve istraflivanja. Kori- ena je aktuelna literatura iz oblasti hepatologije, kako u pregledu literature, tako i u diskutovanju dobijenih rezultata. Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje i prihvata doktorsku disertaciju kandidata, dr Gordane Petrovi pod naslovom: ōKlini ko-biohemijske karakteristike nealkoholne masne bolesti jetre kao manifestacije metaboli kog sindromaö.

Zbog svega navedenog Komisija predlafe Nastavno-nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Ni-u da usvoji pozitivnu ocenu izra ene doktorske disertacije i da odobri dr Gordani Petrovi , specijalisti interne medicine javnu odbranu.

Komisija za ocenu i odbranu
doktorske disertacije:

Prof. dr Aleksandar Nagorni, predsednik

Prof. dr Goran Bjelakovi , mentor i lan

Prof. dr Dragan Mihailovi , lan

Prof. dr Tatjana Jevtovi -Stoimenov, lan

Prof. dr Petar Svorcan, lan

Ocena naučnog doprinosa doktorske disertacije

Ura ena doktorska disertacija predstavlja originalni nau no-istraffiva ki rad kandidata sa zna ajnim doprinosom u oblasti hepatologije. Istraflivanje je potvrdilo da je NAFLD hepata na manifestacija metaboli kog sindroma. Doprinos ovog istraflivanja je u rasvetljavanju zna aja genskog polimorfizma PNPLA3 gena u razvoju bolesti nezavisno od metaboli kih rizi nih faktora i nalafenja novih neinvazivnih biomarkera, kao -to je citokeratin-18 u dijagnozi NAFLD i NASH. Istraflivanje je ukazalo na zna aj ultrazvuka u dijagnozi bolesti i proceni stepena steatoze jetre. Biopsiju jetre treba razmotriti kod pacijenata sa NAFLD i metaboli kim sindromom, dijabeti ara sa NAFLD i kod pacijenata sa vrednostima NAFLD fibroznog skora koji ukazuje na uznapređovalu fibrozu.

IV Evaluation of scientific contribution of doctoral dissertation

The present doctoral dissertation stands for an original scientific research work of the candidate, with a significant contribution to the field of hepatology. This research has confirmed that NAFLD is a hepatic manifestation of metabolic syndrome. The contribution of the research is in clarifying the importance of PNPLA3 gene polymorphism in the development of the disease, independent of metabolic risk factors, and the importance of finding new noninvasive biomarkers such as cytokeratin-18 for the diagnosis of NAFLD and NASH. The research also emphasized the importance of ultrasound in the diagnosis of the disease and grading of hepatic steatosis. Liver biopsy should be considered in patients with NAFLD and metabolic syndrome, in diabetics with NAFLD, and those whose values of the NAFLD fibrosis score indicate advanced fibrosis.