

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 23/10/2015. godine, broj 5940/1, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Koncentracija nitrita u krvi kod obolelih od hipotireoze kao parametar za uvođenje supstitucione terapije “

kandidata mr sci. dr Zorana Gluvića, zaposlenog na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao klinički asistent na katedri za internu medicinu-uža naučna oblast endokrinologija i u nastavnoj bazi Medicinskog fakulteta u Beogradu- Kliničko bolničkom centru Zemun-Beograd na Klinici za internu medicinu, Služba za endokrinologiju i dijabetes.

Mentor je Prof. dr Miloš Žarković, komentor je Prof. dr Biljana Putniković-Tošić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Jasmina Ćirić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandar N. Nešković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Mirjana Šumarac Dumanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Božo Trbojević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu u penziji
5. Prim. dr sci. med. Zorica Rašić-Milutinović, naučni savetnik u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Zorana Gluvića napisana je na 99 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 2 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** su definisana tri jasna odeljka- uticaj supkliničke i kliničke hipotireoze na razvoj ateroskleroze, potom odeljak o laboratorijskim parametrima ateroskleroze, azot monoksidu i njegovim stabilnim metabolitima- nitratima (NO₃) i nitritima (NO₂) i njihov odnos sa aterosklerozom i hipotireozom, kao i treći odeljak- stavovi o primeni levotiroksina u supkliničkoj i kliničkoj hipotireozi i karakteristike ateroskleroze po uspostavljanju normalnog nivoa TSH nakon primene leka.

Ciljevi rada su precizno i jasno definisani. Sastoje se od prikaza merenja koncentracije NO₂ u krvi ispitanika sa hipotireozom i eutireoidnih kontrolnih ispitanika, potom utvrđivanja korelacije između koncentracija TSH, fT₄ i NO₂ u krvi, i na kraju, od prikazivanja uticaja supstitucione terapije levotiroksinom (LT₄) na koncentraciju NO₂ u krvi.

U poglavlju **Materijal i metode** opisan je protokol studije, sa jasnim opisom mesta sprovođenja studije, preciznim navođenjem inkluzionih i ekskluzionih kriterijuma za uključivanje ispitanika u studiju. Potom su opisani biohemijski i antropometrijski parametri koji su određivani kod ispitanika, kao i precizna metodologija njihovog određivanja. Za potrebe studije je definisan Indeks metaboličkog opterećenja (IMO), pokazatelj povećanog kardiometaboličkog rizika u ispitivanoj populaciji. U IMO ulaze sledeće četiri ispitivane varijable: BMI >25kg/m², sistolni pritisak ≥130mmHg ili dijastolni pritisak ≥90mmHg, HbA1c ≥5.7% i trigliceridi (TG) ≥1.7mmol/L. Prisustvo makar dve od ukupno četiri moguće

varijable, smatrano je prisustvom izraženog kardiometaboličkog rizika u ispitivanoj populaciji. Nakon toga je predstavljeno određivanje koncentracije NO₂, sa detaljnim opisom Grisove reakcije. Koncentracija NO₂ je određivana u Institutu „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za molekularnu genetiku i radiobiologiju (laboratorija Prof. dr Esme R. Isenović, naučnog savetnika). Potom je predstavljena statistička metodologija, sa navođenjem korišćenih metoda deskriptivne i analitičke statistike. Nivo statističke značajnosti je 0,05.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani svi dobijeni rezultati i jasno predstavljani tabelarno (12) i grafički (7).

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 389 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji sprovedena je studija preseka, kojom su obuhvaćene 82 ispitanice, podeljene u 3 grupe (supklinička hipotireoidna-skH, klinička hipotireoidna- kH i eutireoidna kontrola), kod kojih je određivan nivo NO₂ pre i nakon primene levotiroksina (LT4) i uspostavljanja eutireoidnog ranga TSH. Prosečne inicijalne koncentracije NO₂ u ispitivanoj populaciji su iznosile 16,69±16,32 (0,95-71,00) μM. Najniže koncentracije NO₂ se registruju u skH grupi, a najviše u kontrolnoj eutireoidnoj grupi. Izmerene koncentracije NO₂, se nalaze u predloženom referentnom opsegu za adulte, odnosno adultne osobe ženskog pola. U okviru studije nije zabeležen uticaj TSH i fT4 na koncentracije NO₂, pri čemu je uočena pozitivna korelacija inicijalnih koncentracija NO₂ sa nivoima TG među grupama ispitanica. Kontrolne koncentracije NO₂ po uspostavljanju laboratorijskog eutireoidizma indukovano primenom LT4 (medijana primene LT4 je 3 meseca) su u normalnom rasponu vrednosti za pomenute referentne populacije – 14,99±11,93 (0,76-50,46) μM i nisu se razlikovale od prosečnih inicijalnih koncentracija NO₂. Prilagođavanjem vrednosti NO₂ za

parametre metaboličkog rizika i godine života, pokazana je statistički značajna razlika između obolelih od hipotireoidizma i kontrole grupe. Nije zabeležen uticaj TSH i fT4 na inicijalne koncentracije NO₂. Analizom korelacija nivoa NO₂ sa antropometrijskim, hormonskim i lipidnim parametrima, zapažena je statistički značajna korelacija nivoa NO₂ sa BMI, HbA1c, kao i nivoom TG. Prosečne koncentracije NO₂ po uspostavljanju laboratorijskog eutireoidizma su pokazale trend opadanja u skH, odnosno porasta u kH grupi, ali bez dostizanja statističke značajnosti u odnosu na inicijalne vrednosti. Ispitanice sa metaboličkim rizikom imale su značajno više koncentracije NO₂.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Odnos između hipotireoidizma i ateroskleroze je nedvosmisleno potvrđen (Hak i sar. 2000, Ichiki T 2010, Lu i sar. 2015). Razumevanje efekata hipotireoidizma na morfološke i hemodinamske parametre funkcionalnog statusa KS, kao indikatora pojave rane ateroskleroze, je od velikog je značaja u smislu pravovremenog uvođenja supstitucione terapije LT4.

Promene u koncentracijama NO₂, kao NO metabolita, su prisutne u brojnim patofiziološkim stanjima, poput dijabetesa (Maejima i sar. 2001), metaboličkog sindroma (Ueyama i sar. 2008), kao i KVB (Winlaw i sar. 1994).

U ovoj studiji nije registrovano statistički značajno smanjenje koncentracije NO₂ kod pacijenata sa skH u poređenju sa kontrolama, za razliku od drugih rezultata studija, poput one koju su objavili Kumar i aut. (2012), u kojoj je pokazano da je nivo NO bio niži, ali bez statističke značajnosti u grupi skH u odnosu na eutireodne kontrole, pri čemu je nivo NO negativno korelisao sa porastom TSH. Smanjena produkcija NO je dokazana u hipertireoidnih (Arikan i sar. 2007), obolelih od kH (Arikan i sar. 2007), kao i od skH (Ozcan i sar. 2005).

Za oba pola i različite starosne grupe u populaciji zdravih odraslih osoba, referentni opseg za NO metabolite je 10,3-66,8μM, a po polovima- za muški 11,5-76,4μM, a za ženski 10,1-65,6μM (Ghasemi i sar. 2010). Slične rezultate prikazuje i Romitelli i sar. (2007), koji je u grupi 50 zdravih ispitanica identičnim (Grisovim metodom), definisao referentni opseg NO od 8,2-75μM, dok je određivanjem metodom gasne hromatografije, koji se smatra najtačnijim metodom kvantifikacije nivoa NO, referentni opseg iznosio 19,9-85,0μM. Watanabe i sar.

(2000) su ispitivanjem 263 odrasle zdrave osobe (145 muškog i 118 ženskog pola) definisali interkvartilni opseg za NO metabolite od 34,4-51,1 tj. 24,8-50,7 μ M za muški odnosno ženski pol. Posmatrano po godinama života, u studiji Ghasemija i sar. (2010), najniže i najviše granične referentne vrednosti su registrovane u klasterima od 20-30 godina i >50 godina života. Više gornje granice referentnih vrednosti za NO su objašnjene uticajem menopauze (Ghasemi i sar. 2010, Watanabe i sar. 2000), obzirom na veću ekspresiju iNOS u uslovima deficijencije estrogena (Higashino i sar. 2007). Takođe, koncentracije NO su veće kod inače zdravih žena koje su gojazne, što se objašnjava verovatno povećanom produkcijom NO u masnom tkivu (Olszanecka-Glinianowicz i sar. 2004). Sa druge strane, niže koncentracije NO se registruju kod mladih osoba (Ghasemi i sar. 2010, Gruber i sar. 2008).

Poput studije Gaoa i sar. (2015), i u drugim studijama je pokazan niži nivo NO metabolita u grupi skH u odnosu na zdrave eutireoidne kontrole (Taddei i sar. 2003, Woo i sar. 1997, Kumar i sar. 2012, Gaoi sar. 2015). Pre primene LT4, koncentracije NO metabolita se razlikuju između zdravih i skH grupe (niže u skH grupi), a po primeni LT4 dolazi do statistički značajnog porasta NO metabolita u skH grupi (Gao i sar. 2015). Nivoi NO metabolita su bili značajno niži u skH grupi, što se objašnjava dozno-zavisnim efektom porasta TSH, iako su nivoi fT4 bili slični među grupama skH i eutireoidne kontrole. Nakon šest meseci od uspostavljenog stabilnog eutireoidnog ranga TSH, dolazi do porasta NO metabolita (Gao i sar. 2015). To pokazuje da TSH na endotelne ćelije deluje nezavisnim mehanizmom od promena nivoa perifernih tireoidnih hormona (Gao i sar. 2015), što potvrđuje i već pomenuta ekspresija TSH receptora na endotelnim ćelijama (Balzan i sar. 2012, Donnini i sar. 2003).

Studijom Gluvića i sar. (2015) pokazana je značajna korekcija faktora rizika za aterosklerozu nakon 3 meseca primene LT4. Nakon uspostavljanja normalnih vrednosti TSH, oboleli od hipotireoidizma su značajno korigovali vrednosti BMI, sistolnog pritiska, dijastolnog pritiska, ukupnog holesterola, kao i LDL-H u odnosu na preterapijske vrednosti. Slične rezultate u smislu korekcije nivoa ukupnog holesterola, kao i LDL-H prikazani su i nakon 6 meseci primene LT4 (Monzani i sar. 2004). Kvalitet korekcije lipidnog disbalansa po uspostavljanju biohemijskog eutireoidizma nadoknadom tiroksina zavisi od težine i trajanja

snižene funkcije štitaste žlezde, ali i od težine hiperholesterolemije (Kahaly i sar. 2000, Tanis i sar. 1996, Kung i sar. 1995). Takođe, ishrana, inicijalni BMI i pušenje mogu primarno uticati na nivo LDL-H (Mueller i sar. 1995). Efekat korekcije hiperholesteolemije i nivoa LDL-H je obično izraženiji kada je TSH >10mIU/ml (Danese i sar. 2000, Tanis i sar. 1996).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Gluvic Z, Sudar E, Tica J, Jovanovic A, Zafirovic S, Tomasevic R et al. Effects of levothyroxine replacement therapy on parametres of metabolic syndrome and atherosclerosis in hypothyroid patients: a prospective pilot study. IJE 2015; 147070.
2. Stanimirovic J, Obradovic M, Zafirovic S, Resanovic I, Bogdanovic N, Gluvic Z et al. Effects of altered hepatic lipid metabolism in regulation of hepatic iNOS. Clin Lipidol 2015; 10(2): 167-75.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „ **Koncentracija nitrita u krvi kod obolelih od hipotireoze kao parametar za uvođenje supstitucione terapije** “ dr Zorana Gluvića predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama koji učestvuju u patogenezi ateroskleroze u hipotireoidnim stanjima.

Uzimajući u obzir podatke iz literature, zajedno sa rezultatima prikazanim u okviru ove doktorske disertacije, kao i naše objavljene i preliminarne rezultate koji se odnose na efekte NO₂ u stanjima hipotireoidizma, sugeriše se da bi NO₂ mogao biti jedan od bitnih parametara za procenu uvođenja supstitucione terapije LT₄. Iako izostanak statističke značajnosti u ranim promenama koncentracija NO₂ ne ide u prilog hipotezi da inicijalna koncentracija NO₂ može biti pouzdan dodatni parametar u započinjanju terapije LT₄ kod primarnog hipotireoidizma, a prevashodno skH, bilo bi korisno dizajnirati kliničku studiju gde će se pratiti kasniji efekti LT₄ na koncentracije NO₂ (npr. 6, 12 ili više meseci od uspostavljanja stabilnog eutireoidizma), ali i evaluirati njihova asocijacija sa lipidnim i

drugim inflamatornim parametrima i eventualna potreba za optimizacijom terapije LT4. Razumevanje molekularnih mehanizama, koji su u osnovi efekata NO₂, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima, kao što je stanje hipotireoidizma, stoga je od velike važnosti.

Autor je konstatovao i limitacije ove studije - relativno mala populacija bolesnika i kontrola, kao i izražena heterogenost podataka (različito životno doba, pojedinačni slučajevi postmenopauzalnih žena). Buduće studije bi trebalo sprovesti na većem uzorku da bi se što bolje sagledali efekti supstitucije LT4 na nivo NO₂, kao NO metabolita, kao i lipidne parametre kod obolelih od skH i kH u Srbiji. Takođe, uključivanjem veće populacije bolesnih i kontrola, omogućiće se rasvetljenje odnosa NO₂ i TSH, ali i lipida i inflamatornih markera u stanjima skH i kH.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Zorana Gluvića i odobri njenu javnu odbranu, radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05/11/2015.

Članovi Komisije:

Prof. dr Jasmina Ćirić

Prof. dr Aleksandar N. Nešković

Prof. dr Mirjana Šumarac Dumanović

Prof. dr Božo Trbojević

Prim. dr sci. med. Zorica Rašić-Milutinović, NSV

Mentor:

Prof. dr Miloš Žarković

Komentor:

Prof. dr Biljana Putniković-Tošić
