

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 22.12.2017. godine, broj 5940/14, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Povezanost nivoa adipocitokina i različitih podtipova lipodistrofije kod bolesnika sa HIV infekcijom“

kandidata dr Danice Cvetković (devojačko Srdić), zaposlene u Sektoru Istraživanja i Razvoja, Hemofarm A.D., u Službi Medicine. Mentor je Prof. dr Gordana Dragović Lukić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Đorđe Jevtović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. Dr Milica Bajčetić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Viktorija Dragojević Simić, profesor Medicinskog fakulteta VMA

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Danice Cvetković napisana je na ukupno 100 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 14 tabela, 3 grafikona i 5 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta predstavlja HIV i AIDS, i na adekvatan način je opisana epidemiologija, patogeneza i klinička slika HIV infekcije. Opisana je strategija lečenja HIV/AIDS bolesnika koja podrazumeva primenu 3 ili više antiretrovirusnih lekova različitih mehanizama dejstva. Detaljno su navedena neželjena dejstva koja se mogu javiti prilikom primene kombinovane antiretrovirusne terapije (cART), sa posebnim osvrtom na lipodistrofiju. U uvodu su precizno opisana 3 podtipa lipodistrofije (lipoatrofija, lipohipertrofija, mešoviti tip lipodistrofije). Detaljno su opisana dosadašnja saznanja vezana za kompleksnu ulogu masnog tkiva koje oslobađa u cirkulaciju biološki aktivne peptide, odnosno adipocitokine (adiponektin, leptin, rezistin, interleukini (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10; IL-1 α , IL-1 β), faktor tumorske nekroze (TNF- α , inhibitor aktivatora plazminogena (PAI-1), monocitni hemotaksni protein-1 (MCP-1), faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF), cistatin C). Poseban osvrt je zabeležen u vezi uloge adipocitokina u lipodistrofiji, kao i pojedinim podtipovima lipodistrofije kod HIV/AIDS bolesnika.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od utvrđivanja učestalosti lipodistrofije, kao i podtipova lipodistrofije, i ispitivanja povezanosti dužine trajanja cART-a i broja cART kombinacija sa pojavom lipodistrofije (odnosno odgovarajućeg podtipa lipodistrofije). Takođe, kao cilj rada se navodi i ispitivanje povezanosti nivoa adipocitokina (adiponektin, rezistin, leptin, interleukini (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10; IL-1 α , IL-1 β), TNF- α , PAI-1, MCP-1, VEGF, EGF, IFN- γ , cistatin C) kod bolesnika sa HIV/AIDS-om sa i bez lipodistrofije, kao i kod bolesnika sa HIV/AIDS-om sa različitim podtipovima lipodistrofije.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o istraživanju koje je imalo karakteristike studije preseka. Uključeni su pacijenti lečeni na Odeljenju Klinike za infektivne i tropske bolesti „Dr Kosta Todorović“ Kliničkog Centra Srbije, sa potvrđenom dijagnozom HIV infekcije i/ili dijagnozom AIDS-a. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije. HIV/AIDS bolesnici su podeljeni u 2 grupe: 1) sa lipodistrofijom i 2) bez lipodistrofije. Pacijenti sa lipodistrofijom su, nakon toga, u zavisnosti od tipa promena masnog tkiva, klasifikovani u 3 podgrupe: lipoatrofija, lipohipertrofija i mešoviti tip lipodistrofije. Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreno je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključjenja u istraživanje.

Detaljno je opisano uzimanje uzoraka krvi od HIV/AIDS pacijenata, centrifugiranje i zamrzavanje na -70 °C, kao i transport uzoraka u suvom ledu u Veliku Britaniju, gde je na

Odeljenju za Kliničku biohemiju, *Royal Free Hospital (RFH), University College London*, London, Velika Britanija, urađena analiza svih biohemijskih parametara. Dobijena je izvozna dozvola za transport biološkog humanog materijala. U istraživanju je korišćena biočip tehnologija - BAT (*Biochip Array Technology*) (*Randox Laboratories Ltd.*, London, Velika Britanija), koja omogućava istovremeno izvođenje dijagnostičkih testiranja iz pojedinačnog uzorka velikog broja adipocitokina.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

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 271 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U istraživanje je uključeno 66 HIV/AIDS bolesnika; registrovano je 29 pacijenata sa lipodistrofijom, od toga 15 pacijenata je imalo lipoatrofiju, 4 pacijenta lipohipertrofiju, a 10 pacijenata je imalo mešoviti tip lipodistrofije. Trideset i sedam pacijenata je bilo bez lipodistrofije. Pacijenti sa lipodistrofijom su bili značajno stariji u odnosu na pacijente bez lipodistrofije ($47,8 \pm 8$ god. vs. $41,3 \pm 12,1$ god., $p = 0,006$), i u dužem vremenskom periodu primali antiretrovirusnu terapiju (106 meseci, IQR (55,2 – 143,2 meseca) kao i veći broj cART kombinacija (3,5, IQR (2 -5)) u poređenju sa pacijentima bez lipodistrofije (32 meseca, IQR (23,5 – 57,5) i 1 cART kombinacija, IQR (1-2)) ($p < 0.001$).

Pacijenti sa lipodistrofijom su imali više vrednosti adiponektina, i niže vrednosti leptina i rezistina, u poređenju sa vrednostima ovih adipocitokina u grupi pacijenata bez lipodistrofije, ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Upoređivanjem vrednosti adipocitokina kod podgrupa pacijenata sa lipodistrofijom (lipoatrofija, lipohipertrofija, mešoviti tip lipodistrofije) i pacijenata bez lipodistrofije, pokazano je da su vrednosti leptina i adiponektina bile statistički značajno veće kod pacijenata sa lipohipertrofijom ($p = 0,039$ za leptin i $p = 0,011$ za adiponektin). Nisu registrovane razlike u vrednostima rezistina između pacijenata sa različitim podtipom lipodistrofije i pacijenata bez lipodistrofije. Poređenjem između 3 podgrupe pacijenata sa lipodistrofijom, vrednosti sva 3 adipocitokina su bila niža kod pacijenata sa lipoatrofijom u odnosu na pacijente sa lipohipertrofijom i mešovitim tipom lipodistrofije. Međutim, statistički značajne razlike unutar grupe pacijenata sa lipodistrofijom

su bile samo za adiponektin i leptin: pacijenti sa lipoatrofijom su imali značajno niže vrednosti leptina u poređenju sa pacijentima sa lipohipertrofijom ($p = 0,020$) i pacijentima sa mešovitim tipom lipodistrofije ($p = 0,027$), dok su pacijenti sa lipohipertrofijom imali značajno više vrednosti adiponektina u poređenju sa pacijentima sa lipoatrofijom ($p = 0,027$) i pacijentima sa mešovitim tipom lipodistrofije ($p = 0,028$).

Pacijenti sa lipodistrofijom su imali niže vrednosti IL-4 i IL-10 u poređenju sa vrednostima ovih interleukina u grupi pacijenata bez lipodistrofije. Razlika u vrednostima IL-4 i IL-10 je bila statistički značajna ($p = 0,008$ za IL-4; $p = 0,027$ za IL-10). Upoređivanjem vrednosti interleukina kod podgrupa pacijenata sa lipodistrofijom (lipoatrofija, lipohipertrofija, mešani tip lipodistrofije) i pacijenata bez lipodistrofije, vrednosti IL-4 su bile statistički značajno više kod pacijenata sa lipoatrofijom ($p = 0,043$) a vrednosti IL-10 statistički značajno niže ($p = 0,031$).

Pacijenti sa lipodistrofijom su imali niže vrednosti TNF- α , VEGF, MCP-1 i EGF, kao i više vrednosti IFN- γ , cistatina C i PAI-1, u odnosu na pacijente bez lipodistrofije, ali nije bilo statistički značajne razlike. Upoređivanjem vrednosti ovih citokina kod podgrupa pacijenata sa lipodistrofijom (lipoatrofija, lipohipertrofija, mešoviti tip lipodistrofije) i pacijenata bez lipodistrofije, vrednosti cistatina C su bile statistički značajno veće kod pacijenata sa lipohipertrofijom ($p = 0,001$).

Adiponektin i leptin su dalje korelisani sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima, kao i sa ostalim citokinima koji su mereni u ovom istraživanju. Koncentracije adiponektina u krvi HIV/AIDS bolesnika su bile u pozitivnoj korelaciji sa uzrastom, kao i vrednostima aspartat transaminaze, alkalne fosfataze, interferona gama (IFN- γ) i cistatina C. Dobijeni rezultati pokazuju i negativnu korelaciju koncentracija adiponektina u krvi sa obimom struka, indeksom telesne mase (BMI) kao i nivoom inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1). Koncentracije leptina su bile u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima IL-6, cistatinom C, kao i vrednostima insulina. U cilju preciznije procene korelacije koncentracija adiponektina i leptina u krvi kod HIV/AIDS bolesnika i lipodistrofije, primenjena je i analiza kovarijanse sa „bootstrapping“ metodom. Koncentracije adiponektina i leptina u krvi nisu bile statistički značajno povezane sa prisustvom lipodistrofije ($p = 0,795$ za adiponektin, i $p = 0,646$ za leptin), kada su poređene vrednosti adipocitokina kod pacijenata sa lipodistrofijom i pacijenata bez lipodistrofije. Međutim, kada su pacijenti sa lipodistrofijom podeljeni u 3 podgrupe, analiza kovarijanse je pokazala da korelacija vrednosti adiponektina ostaje statistički značajna u podgrupi pacijenata sa lipohipertrofijom, nakon prilagođavanja korelacionog modela za uzrast, indeks telesne mase (BMI), cistatin C, inhibitor aktivatora

plazminogena 1 (PAI-1) i interferon-gama (IFN- γ) ($p = 0,001$).

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ovom istraživanju, prevalencija lipodistrofije, kao i podtipova lipodistrofije kod HIV/AIDS bolesnika, je bila slična podacima u prethodno objavljenim istraživanjima (Arama i sar., 2014; Freitas i sar., 2014; Belo i sar., 2015). Dosadašnje observacione studije su pokazale veliko variranje u učestalosti lipodistrofije, u zavisnosti od karakteristika ispitanika (pol, uzrast, rasa), vrste i dužine primene antiretrovirusne terapije kao i kriterijuma za postavljanje dijagnoze lipodistrofije (McComsey i sar., 2011; Grunfeld i sar., 2010; Curran i sar., 2012; de Waal i sar., 2013). Nasuprot zemljama u razvoju, prevalencija lipodistrofije kao i lipoatrofije opada u razvijenim zemljama, obzirom da se stari antiretrovirusni režimi zamenjuju sa manje toksičnim lekovima (Guaraldi i sar., 2009.).

HIV/AIDS bolesnici koji su u dužem periodu primali antiretrovirusnu terapiju imali i izraženije promene u redistribuciji adipoznog tkiva, što je u skladu sa prethodno objavljenim istraživanjima (Finkelstein i sar., 2015; Margolis i sar., 2014). Rezultati pokazuju i da su sve tri podgrupe pacijenata sa lipodistrofijom primale i veći broj cART kombinacija, u poređenju sa bolesnicima bez lipodistrofije. Različite cART kombinacije su uglavnom sadržale starije antiretrovirusne lekove, koji se još uvek koriste u Srbiji (Dragović i sar., 2009, Kušić i sar., 2016). Pacijenti sa lipodistrofijom u ovom istraživanju su bili stariji u odnosu na bolesnike bez lipodistrofije. Populacija bolesnika u istraživanju je bila slična zapadnoevropskim zemljama sa dominantnom MSM grupom (populacija muškaraca koji su imali seks sa muškarcima) (Likatavicius i sar., 2011).

Niže koncentracije leptina u krvi su zabeležene kod HIV/AIDS bolesnika sa lipodistrofijom, u poređenju sa bolesnicima bez lipodistrofije. Efekt koji cART ima na koncentracije leptina kod HIV/AIDS bolesnika sa lipodistrofijom je i dalje predmet brojnih kontroverzi. Dok jedni autori (Calmy i sar., 2009; Nagy i sar., 2003; Tsoukas i sar., 2015) prijavljuju hipoleptinemiju kod HIV/AIDS bolesnika sa lipodistrofijom, drugi ističu da cART nema dejstvo na koncentracije leptina (Mynarcik i sar., 2002; Dzwonek i sar., 2007;).

Dobijeni rezultati su slični podacima dobijenim u drugim istraživanjima (Freitas i sar., 2014; Kosmiski i sar., 2008; Nagy i sar., 2003; Kelesidis i sar., 2010), gde su pacijenti sa lipoatrofičnim promenama imali najniže koncentracija leptina u krvi u poređenju sa pacijentima sa lipohipertrofijom, koji su imali najviše koncentracije leptina. U ovom istraživanju, leptin je bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama u krvi IL-6, i insulina, što

je slično rezultatima u prethodno objavljenim studijama (Nagy i sar., 2003; Langkilde i sar., 2015).

Rezultati su pokazali da su pacijenti sa lipodistrofijom imali veće koncentracije adiponektina u krvi, u poređenju sa pacijentima bez lipodistrofije, kao i da su pacijenti sa lipohipertrofijom imali značajno povišene koncentracije ovog adipocitokina, u odnosu na pacijente bez lipodistrofije, kao i u odnosu na pacijente sa lipoatrofijom i mešovitim tipom lipodistrofije. Luo i saradnici su kod HIV/AIDS pacijenata sa lipodistrofijom, lečenih antiretrovirusnom terapijom, pokazali povišene koncentracije adiponektina u poređenju sa pacijentima bez lipodistrofije (Luo i sar., 2009). Iako pojedini autori ističu značaj sniženih vrednosti adiponektina kod HIV/AIDS pacijenata sa lipodistrofijom (Freitas i sar., 2014; Kosmiski i sar., 2008; Addy i sar., 2003), Yamamoto i saradnici su nedavno pokazali da povišene koncentracije adiponektina mogu biti udružene sa smanjenim rizikom od pojave dijabetes melitusa tip II, nezavisno od lokalizacije akumuliranog adipoznog tkiva (Yamamoto i sar., 2014).

Dobijeni rezultati pokazuju da nije bilo značajnih razlika u koncentracijama rezistina, između HIV/AIDS bolesnika sa ili bez lipodistrofije. Bolesnici sa lipohipertrofijom jesu imali više koncentracije ovog citokina u odnosu na pacijente bez lipodistrofije, ali razlika nije bila značajna. Slični rezultati su objavljeni i u drugim istraživanjima (Freitas i sar., 2014; Barb i sar., 2005). Ranade i sar. u svom istraživanju ističu značaj genetske varijacije rezistina koja može biti povezana sa metaboličkim komplikacijama usled primene cART (Ranade i sar., 2008).

Rezultati su pokazali da nema značajnih razlika u vrednostima PAI-1 između HIV/AIDS pacijenata sa lipodistrofijom i bez lipodistrofije, kao i između podgrupa pacijenata sa različitim tipom redistribucije masti. Slične rezultate su pokazali i Padilla i sar. (Padilla i sar. 2011). Rezultati su pokazali i negativnu korelaciju koncentracija adiponektina i inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1), što je u skladu sa istraživanjem Masia i saradnika (Masia i sar., 2010).

U ovom istraživanju su prikazane i značajno niže koncentracije IL-4 kod HIV/AIDS bolesnika sa lipodistrofijom, u poređenju sa pacijentima bez lipodistrofije. Prethodna istraživanja koja su ispitivala IL-4 nisu pokazala razlike između HIV/AIDS bolesnika sa i bez lipodistrofije, kao i između podtipova lipodistrofije (Belo i sar., 2015; Norbiato i sar., 2000). Određena istraživanja su pokazala povezanost IL-4 i insulinske senzitivnosti (Falasca i sar., 2007; Norbiato i sar., 2000; van Exel i sar., 2002).

Rezultati pokazuju i značajno niže koncentracije IL-10 kod HIV/AIDS pacijenata sa lipodistrofijom u poređenju sa pacijentima bez lipodistrofije. Styliou i saradnici su pokazali nishodnu regulaciju nivoa IL-10 usled primene cART-a (Styliou i sar., 1999). Norbiato i saradnici su, slično dobijenim rezultatima pokazali niže koncentracije ovog citokina kod HIV/AIDS bolesnika sa lipodistrofijom (Norbiato i sar., 2000), za razliku od Pontes i saradnika u čijem istraživanju su HIV/AIDS bolesnici sa lipodistrofijom imali više koncentracije IL-10 u odnosu na pacijente bez lipodistrofije (Pontes-Cardoso i sar., 2007).

Nedavno su Liu i saradnici pokazali povezanost cistatina C sa insulinskom rezistencijom, komponentama metaboličkog sindroma i inflamacije (Liu i sar., 2014). Cistatin ima značajnu ulogu u alteraciji adipoznog tkiva, možda čak i važniju od one u bubrežnoj funkciji (Salgado 2012). U do sada objavljenoj literaturi ima vrlo malo radova o cistatinu C kod bolesnika sa HIV infekcijom, a posebno kada je reč o pridruženoj alteraciji adipoznog tkiva odnosno lipodistrofije. Zbog toga su posebno značajni dobijeni rezultati u ovom istraživanju, gde je cistatin C bio značajno povišen kod HIV/AIDS bolesnika sa lipohipertrofijom.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Srdić Danica, Al Musalhi Khawla, Ivan Soldatović, Jelena Nikolić, Đorđe Jevtović, Devaki Nair, Gordana Dragović. **Correlation of Leptin, Adiponectin, and Resistin Levels in Different Types of Lipodystrophy in HIV/AIDS Patients.** *Metab Syndr Relat Disord* 2017; 15(3):153-9.

Gordana Dragović, Srdić Danica, Al Musalhi Khawla, Ivan Soldatović, Jovana Kušić, Đorđe Jevtović, Devaki Nair. **Higher Levels of Cystatin C in HIV/AIDS Patients with Metabolic Syndrome.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017; doi: 10.1111/bcpt.12919.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Povezanost nivoa adipocitokina i različitih podtipova lipodistrofije kod bolesnika sa HIV infekcijom“ dr Danice Cvetković, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja kombinovane antiretrovirusne terapije na pojavu lipodistrofije, odnosno različitih podtipova lipodistrofije. Rezultati pokazuju značajne razlike u koncentracijama adiponektina i leptina, između HIV/AIDS bolesnika sa i bez lipodistrofije, između bolesnika sa lipohipertrofijom i bez lipodistrofije, kao i između različitih podtipova

lipodistrofije. Oba adipocitokina bi mogli biti značajni prognostički markeri kod HIV/AIDS bolesnika sa lipodistrofije. Svi gore navedeni rezultati podržavaju hipotezu da stalno praćenje koncentracija adiponektina, zajedno sa ostalim metaboličkim parametrima, može poboljšati promene u distribuciji adipoznog tkiva koje se javlja kod HIV/AIDS bolesnika koji primaju cART. Pored toga, adiponektin može biti i novi „target“ u novim terapijskim strategijama za lečenje lipodistrofije kod HIV/AIDS bolesnika. Rezultati ovog istraživanja bi mogli biti od koristi i drugim zemljama u razvoju gde se još uvek primenjuju stari antiretrovirusni terapijski režimi.

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 Danice Cvetković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11.01.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dorđe Jevtović

Prof. dr Milica Bajčetić

Prof. dr Viktorija Dragojević Simić

Mentor:

Prof dr Gordana Dragović Lukić
