

Медицински факултет  
Универзитет у Нишу  
Научно-наставном већу  
Одбору за докторске дисертације

**Предмет:**

Извештај комисије о израђеној докторској дисертацији Мирјане Миљковић, спец. др мед.

Одлуком Научно-наставног већа Медицинског факултета, Универзитета у Нишу број: 06-КМ-77/08 од 01.03.2016. године прихваћен је извештај ментора проф. др Љиљане Шаранац о израђеној докторској дисертацији Мирјане Миљковић, студента ДАС-клиничка медицина из Ниша, под одобреним насловом “Процена утицаја лептина, грелина и тироидне функције на тип исхрањености деце и адолесцената”.

У напред наведеној одлуци Научно-наставног већа Медицинског факултета, Универзитета у Нишу, именовани су чланови комисије за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

Проф. др Златко Ђурић, председник  
Проф. др Љиљана Шаранац, ментор и члан  
Проф. др Ивана Стојановић, члан  
Проф. др Силвија Сајић, члан са Медицинског факултета у Београду  
Доц. др Бојко Бјелаковић, члан

Након детаљног прегледа докторске дисертације комисија подноси следећи:

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **I. Општи подаци**

Тема за израду докторске дисертације кандидата др Мирјане Миљковић је одобрена одлуком Научно-наставног већа Медицинског факултета, Универзитета у Нишу, НСВ број: 8/19-01-001/13-023, на седници одржаној 07.03.2013. године у Нишу. Кандидат др Мирјана Миљковић обавила је своје истраживање на Клиници за дечје интерне болести Клиничког центра у Нишу, Институту за биохемију Медицинског факултета у Нишу и у Лабораторији Клинике за дечје интерне болести Клиничког центра у Нишу, у периоду од јануара 2014. до фебруара 2015. године.

### **II. Однос урађене дисертације према пријави и одобрењу теме**

Докторска дисертација “Процена утицаја лептина, грелина и тироидне функције на тип исхрањености деце и адолесцената”, представља оригиналан и самосталан научно истраживачки рад из области Педијатрије, уже области Ендокринологије, са јасно постављеним циљевима који су у складу са задатом темом и применом савремене методе која је детаљно објашњена. Наслов докторске дисертације у потпуности је сагласан са садржајем спроведеног истраживања. Постављени циљеви истраживања и метода су остали непромењени током целог истраживања.

### **III. Технички опис дисертације**

Докторска дисертација садржи све предвиђене делове и писана је у складу са принципима научно-истраживачког рада. Докторска дисертација је написана на 139

страна и састоји се из следећих поглавља: увод, циљ рада и радна хипотеза, испитаници и метод, резултати, дискусија, закључак и литература.

#### IV. Садржајна структура докторске дисертације

У уводном поглављу наведена су досадашња сазнања везана за тему докторске дисертације.

Најпре је описана неуроендокрина регулација хомеостазе енергије и значај осе хипоталамус-хипофиза-штитна жлезда у одржавању ове хомеостазе. Посебно је разматран значај орекситропних хормона, лептина и грелина, у стањима гојазности и потхрањености. Такође је објашњен утицај тироидних хормона на хомеостазу енергије као и интеракција са орекситропним хормонима.

Лептин је полипептид, који се примарно ствара у адипоцитима белог масног ткива. Циркулишуће вредности лептина су директно пропорционалне количини телесне масноће и флукутирају са тренутним променама у калоријском уносу. Поред улоге у контроли уноса хране, лептин делује и као ендокрини и паракрини фактор у регулацији пубертета и репродукције, утиче на тироидну осу регулишући експресију TRH, сматра се да директно стимулише ослобађање T4 из тироидне жлезде и повећава биоактивност TSH. Вредности лептина су повишене код гојазних, а снижене код мршавих.

Грелин се примарно синтетише у желуцу, откривен је 1999. године као први природни ендогени лиганд рецептора хормона раста. Грелин је једини, до сада, изоловани гастроинтестинални пептид који стимулише апетит и унос хране. Препрандијални пораст и постпрандијални пад грелина у серуму људи подржава концепт да грелин има физиолошку улогу у иницијацији obroка, као и контроли уноса хране.

#### Циљеви истраживања

1. Одредити и упоредити концентрације лептина и грелина у испитаника различите исхрањености.
2. Одредити и упоредити концентрације хормона тироидне жлезде T3, T4, fT3, fT4 и TSH у испитаника различите исхрањености.
3. Испитати корелације нивоа лептина и грелина са хормонима тироидне жлезде и TSH у испитаника различите исхрањености.

У поглављу **испитаници и методе** јасно су приказане групе испитаника и коришћене статистичке анализе.

Истраживање представља студију пресека која је обухватила 88 испитаника, који су на основи ITM-SD, сврстани у групу гојазних (36), групу мршавих (25) и контролну групу (27).

Подаци су прикупљани проспективно.

Сви испитаници и њихови законски заступници су пре укључивања били упознати са циљевима истраживања и било им је понуђено да потпишу пристанак за учешће у истраживању, добијена је и сагласност Етичког комитета Медицинског факултета за спровођење истраживања.

Критеријуми за укључивање:

1. деца оба пола узраста > 6 и < 18 година.
2. сагласност деце и њихових законских заступника у писаној форми.

Критеријуми за искључивања:

1. деца узраста < 6 и > 18 година.
2. деца са хроничним болестима.

### 3. деца са акутним инфекцијама.

Сва испитивања су стандардизована по месту рада (амбуланта едокринологије Клинике за дечје интерне болести, Центар за медицинску биохемију и Институт за биохемију Медицинског факултета у Нишу), времену (јутарњи сати) и методи рада.

После узимања анамнезе и клиничког прегледа сва деца су била подвргнута антропометријским мерењима: телесна висина, TV, телесна маса, TM, обим струка и обим кукова, одакле се израчунава OS/OK.

Телесна висина и тежина су мерене дигиталном вагом са стадиометром са прецизношћу од 0,5 cm и 0,5 kg, ујутру, пре доручка, са минимумом одеће.

Из добијених вредности TV и TM је израчунат ITM ( $TM \text{ kg} / TV \text{ m}^2$ ) и одређен ITM-P и ITM-SD..

На основу ITM-P и ITM-SD испитаници су класификовани:

- деца са нормалном исхрањеношћу за пол и узраст, ITM од 3 до 85 перцентила, између -2 SD и +2 SD,
- деца са прекомерном тежином и гојазна за пол и узраст, ITM > 85 перцентила, односно > од +2 SD,
- умерено и тешко потхрањена деца за пол и узраст, испод 3 перцентила, односно < -2 SD.

Обим струка је мерен у нивоу најмање циркумференције између последњег ребра и гребена илијачне кости, у стојећем ставу, после мирног експиријума. Изражаван је у јединицама од 0,5 cm, док је обим кука мерен у нивоу највеће циркумференције кукова и такође изражаван у сантиметрима.

За процену абдоминалне гојазности израчунавани су однос обима струка и кукова. На основу Tanner-а извршена је подела испитаника различите исхрањености на препубертетске и пубертетске.

Лабораторијска испитивања

Крв за лабораторијска испитивања је узимана из кубиталне вене, ујутру, после десетосатног гладовања.

Крвна слика је рађена на апарату PENTRA ES 60 HORIBA Medical, остале анализе: CRP, липидни статус, хепатограм, гликемија су рађени на апарату ERBA Mannheim XL 600.

Тироидни статус је одређиван методом хемилуминисценције на апарату Architect I 2000 SR.

Квантитативне вредности тиреостимулишућег хормона су одређиване хемилуминисцентним микропартикуларним имуноесејем (Architect TSH assay). Нормалне вредности TSH у серуму су од 0,26-3,5 mIU/L. Дневне варијације TSH су незнатне. Стрес не утиче на концентрацију овог хормона. Висок ниво TSH уз снижене концентрације тироидних хормона знак је примарне тироидне инсуфицијенције. Повећана концентрација TSH у еутироидних особа указује на смањену тироидну резерву.

Укупни тироксин, (TT4), је одређиван хемилуминисцентном методом коришћењем кита Architect Total T4. Нормалне вредности TT4 су 60-155 pmol/L. Концентрација T4 повећана је у хипертиреози, а снижена у хипотиреози.

Концентрација слободног T4 (fT4) прати концентрацију укупног T4. Слободни тироксин одређиван је истом методом уз употребу Architect Free T4 кита, а референтне вредности су 10-25 pmol/L.

Укупни тријодтиронин, (TT3), одређиван је хемилуминисцентном методом уз коришћење Architect Total T3 имуноесеја. Нормалне вредности T3 су 1,2-3,0 pmol/L. Одређивање T3 представља поуздан параметар за утврђивање хипертиреозе а мање је поуздан за дијагностику хипотиреозе од T4. Слободни T3, (fT3), одређиван је истом

методом уз употребу Architect Free T3 имуноесеја. Референтне вредности су: 4-8 pmol/L.

#### Лептин

Вредности лептина у серуму мерене су употребом Quantikine Elisa Human Leptin Immunoassay USA&Canada. Сензитивност есеја је била 7,8 pg/ml са intra-assay коефицијента варијације (CV) 3,3% и inter-assay CV 5,4%.

Деца нису узимала храну 10 часова пре узимања узорка крви за анализе. После узорковања крв је центрифугирана на 1500 обртаја по минути у трајању од 10 минута. Издвојени серум је замрзаван на -20oC до тренутка извођења ELISA теста.

Концентрација лептина је повишена код гојазних а снижена код мршавих.

#### Грелин

Укупне вредности грелина мерене су употребом комерцијалног Хуманог Grelin Elisa Kita Cusabio Biotech Co.LTD. Сензитивност есеја је била 0,156 pg/ml, и intra-assay коефицијент варијације (CV) био је <8% и inter-assay CV <10%.

Из истог замрзнутог узорка серума одређивана је и концентрација грелина.

Код гојазних вредности грелина су ниже док је код мршавих грелин повишен.

#### Инсулин

Вредности инсулина у серуму мерене су ELISA тестом употребом кита MG59011-Insulin ELISA-IBL international из замрзнутог узорка серума. Сензитивност есеја била је 1,76  $\mu$ U/ml, intra-assay коефицијент варијације био је 2,6%, док је CV inter-assay био 2,88%.

Инсулинска резистенција је израчунавана помоћу HOMA индекса (енг. Homeostasis Model Assessment), по формули Matthews-а: гликемија (у mmol/L) x инсулинемија (uIU/ml)/22,5.

По завршетку истраживања креирана је јединствена база података у Excel-у 2007. Статистичка анализа података обављена је програмским пакетом SPSS 15.0. За континуалне варијабле срачунаване су средње вредности (X), стандардне девијације (SD) и медијане (Me), што је у табелама представљено као  $X \pm SD$  (Me), а дат је и опсег вредности (минимална–максимална). Категоријске варијабле су представљене апсолутним и релативним (процентуано) бројевима.

За испитивање нормалности дистрибуције континуалних варијабли примењиван је Шапиро-Вилк (Shapiro-Wilk) тест.

Поређење вредности континуалних варијабли између група, у зависности од нормалности расподеле, вршено је Студентовим т тестом (Student t-test) независних узорака, у случају нормалне расподеле, или Ман Витнијевим тестом (Mann-Whitney test), у случају да расподела одступа од нормалне.

Тестирање пропорције категоријских варијабли између група испитивано је Пирсоновим  $\chi^2$  тестом (Pearson's chi square test) или одговарајућим модификацијама овог теста.

У зависности од нормалности расподеле варијабли, веза између континуалних варијабли утврђивана је Пирсоновим коефицијентом линеарне корелације (Pearson's coefficient of linear correlation) – r, код нормалних расподела, или Спирмановим коефицијентом корелације рангова (Spearman rank correlation coefficient)  $\rho$ , у случају одступања од нормалне расподеле коефицијентом корелације.

**Резултати** истраживања приказани су табеларно и графички, 20 табела и 24 графикана. Резултати су статистички обрађени и систематизовани по редоследу постављених циљева и задатака истраживања. Добијени резултати потврдили су хипотезу и циљеве истраживања.

На основу вредности индекса телесне масе (ITM-SD) испитаници су били подељени у три групе, групу гојазних у којој је било 36 (40,91%), групу мршавих са 25 (28,41%) и контролну групу коју је чинило 27 (30,68%) испитаника.

Порођајна телесна маса била је највећа у групи гојазних, статистички значајно виша но у групи мршавих. Вредности свих наведених антропометријских параметара биле су највеће у групи гојазних, са статистичком значајношћу, у односу на обе групе, веће су вредности ТМ, OS, OK, OS/OK, ITM, ITM-SD и ITM-P ( $p < 0,001$ ).

Изузев OS/OK сви параметри у табели статистички били су већих вредности у контролној у односу на групу мршавих, на нивоу статистичке значајности од  $p < 0,001$ , а нивоу од  $p < 0,05$  већи су TV и TV-P.

Вредност лептина, лептина/ТМ и односа лептин/грелин били су највећи у групи гојазних, сви статистички значајно у односу на мршаве (код којих су ове вредности уједно и најмање),  $p < 0,001$ , а лептин и однос лептин/грелин и у односу на контролу ( $p < 0,01$ ). Вредности преостала три параметра: грелина, грелина/ТМ и односа грелин/лептин биле су највеће код мршавих, а најниже код гојазних, с тим да су грелин/ТМ и грелин/лептин статистички значајно виши и за гојазне и контролу  $p < 0,001$ .

Параметар TSH био је статистички значајно већи код гојазних испитаника у односу на контролну и групу мршавих ( $p < 0,001$ ) и позитивно је корелисао са лептином, значајне корелације утврђене су код мршавих испитаника и то негативне корелације средњег интензитета између лептина и TSH и грелина и T4 ( $p < 0,01$ )

У односу на групе мршавих и контролну у групи гојазних статистички су значајно биле веће вредности CRP ( $p < 0,05$ ) и гликемије ( $p < 0,001$ ). Вредности HOMA-IR су биле најмање у групи мршавих, статистички значајно мање у односу на групу гојазних и контролну групу. У групи мршавих испитаника статистички значајно биле су веће вредности TGL ( $p < 0,001$  у односу на мршаве,  $p < 0,01$  у односу на контролну), као и АЛТ ( $p < 0,001$  у односу на мршаве,  $p < 0,05$  у односу на контролну), HDL је имао највише вредности у групи мршавих, статистички значајно веће у односу на гојазне ( $p < 0,001$ ), LDL, AST, као и укупни холестерол и билирубини били су највиши у групи гојазних, али без статистички значајно веће вредности у односу на остале групе.

У поглављу "**Дискусија**" детаљно и систематично су размотрени добијени резултати по постављеним задацима дисертације и упоређени са одговарајућим подацима из литературе. Кључни елементи дискусије показују да добијени резултати корелирају са актуелним светским саопштењима из испитиване области. Приказани су оригинални резултати о значају удруженог дејства орекситропних хормона и хормона штитне жлезе за хомеостазу енергије.

У поглављу "**Закључак**" су наведени закључци истраживања, који су у складу са постављеним циљевима и хипотезом истраживања. На основу добијених резултата у нашем истраживању закључујемо:

Два кључна хормона која регулишу апетит и потрошњу енергије; грелин из стомака и лептин продукт масног ткива, испитивани су у овој студији код гојазне, нормално исхрањене и мршаве деце и адолесцената. Нађене су значајне разлике у овим орекситропним хормонима, затим грелин/лептин, као и лептин/грелин профили у различитим типовима исхрањености.

- Вредности лептина су биле највише у групи гојазне деце у поређењу са нивоима код нормално исхрањене и мршаве деце.
- Нивои лептина позитивно су корелисали са ауксолошким параметрима испитаника, ТМ, ITM, вишком ТМ и TV.
- Однос лептин/ТМ био је значајно већи у групи гојазне деце и контролној групи у односу на мршаву децу.
- Вредности грелина су биле највише у групи мршаве деце, а најниже у групи

- гојазне деце.
- Однос грелин/ТМ је био највиши код мршаве деце а најнижи у групи гојазне деце, док је однос грелин/лептин показивао највише вредности у групи мршаве деце.
  - Однос лептин/грелин је био највиши у групи гојазне деце.
  - Односи грелин/лептин и лептин/грелин показали су инверзне вредности у гојазних и потхрањених што указује на значај успостављања одређеног здравог баланса између ова два орекситропна сигнална протеина.
  - Вредности fT3 су биле најниже код гојазне деце, што сведочи о смањеној потрошњи енергије гојазних, упливисној од нивоа активне фракције тироидних хормона, док су вредности fT4 биле сличне код свих испитаника различите исхрањености.
  - Вредности TSH су биле највише у групи гојазне деце и позитивно су корелисале са нивоом лептина из чега се закључује да лептин утиче на елевацију TSH, највероватније преко регулације сензитивности рецептора за извршне тироидне хормоне.
  - Негативна, слаба корелација између грелина и TSH, као и грелина и T4 сугерише постојање супресије тироидне осовине у гладовању.

Супримирани нивои грелина у нашој групи гојазне деце и вишеструко увећани у потхрањених говоре у прилог значајног утицаја овог хормона у адаптацији на услове прекомерне исхране и гладовања. За нормалну исхрањеност, неопходно је успоставити здраву равнотежу између ова два хормона. У овом комплексном систему регулације који укључује и тироидне хормоне важни су генетски утицаји и фактори средине што захтева додатна истраживања. Ово је прва студија која испитује нивое грелина, лептина и тироидних хормона у различитим типовима исхрањености деце и адолесцената у нашој земљи. Резултати су омогућили боље разумевање орекситропне хормонске регулације у поремећајима као што су гојазност и потхрањеност.

## **V. Оцена научног доприноса докторске дисертације**

Урађена докторска дисертација представља оригинални научно-истраживачки рад кандидата са значајним доприносом у области Педијатрије. Резултати омогућују боље разумевање хормонске регулације различитих типова исхрањености. Ова студија показује односе орекситропних сигналних протеина у различитим типовима исхрањености код деце и њихово садејство са тироидним хормонима које се одражава на телесну масу деце. У условима када гојазност добија епидемијске размере, а све чешћа је и потхрањеност, ова студија доказује различитост регулације грелина, лептина и тироидних хормона у овим поремећајима и тиме даје допринос у истраживању поремећаја исхрањености у дечјем узрасту. Ово је прва студија у Србији која испитује нивое грелина у различитим типовима исхрањености деце, узимајући у обзир и друге хормоне одговорне за енергетски баланс.

## **ЗАКЉУЧАК:**

Докторска дисертација је успешно реализована у складу са постављеним циљевима истраживања. Добијени резултати су прегледно приказани тако да дају одговоре на постављене циљеве истраживања. Коришћена је актуелна литература из испитиване области, како у прегледу литературе, тако и у дискутовању добијених резултата. Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује и прихвата докторску дисертацију кандидата, др Мирјане Миљковић под насловом: "Процена утицаја лептина, грелина и тироидне функције на тип исхрањености деце и адолесцената".

Због свега наведеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Универзитета у Нишу да усвоји позитивну оцену израђене докторске дисертације и да одобри др Мирјани Миљковић, специјалисти педијатрије јавну одбрану.

Комисија за оцену и одбрану  
докторске дисертације:

Проф. др Златко Ђурић, председник

---

Проф. др Љиљана Шаранац, ментор  
и члан

---

Проф. др Ивана Стојановић, члан

---

Проф. др Силвија Сајић, члан

---

Доц. др Бојко Бјелаковић, члан

---