

Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Na IV redovnoj sednici Nastavno – naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 15.03.2016. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

Prof. dr Elena Kršljak, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Milan Brajović, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Miroslav Radenković, Medicinski fakultet, Beograd

Za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom ACE INHIBITORI, ENALAPRIL, I MEHANIZMI ORALNE HOMEOSTAZE: PROTOK PLJUVAČKE I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Kandidat: asist. dr Ljiljana Đukić

Mentor: Prof. dr Dragica Stojić

Komentor: Doc. dr Jelena Roganović

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Ljiljane Đukić pod nazivom **ACE INHIBITORI, ENALAPRIL, I MEHANIZMI ORALNE HOMEOSTAZE: PROTOK PLJUVAČKE I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA** napisana je na 156 strana uz prikaz 15 tabela, 4 grafikona

i 421 reference iz savremene, značajne naučne literature. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, hipoteze, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke i literaturu.

U **Uvodu** su opisana dosadašnja istraživanja o mehanizmima lučenja pljuvačke, njenom sastavu, ulogama, s posebnim osvrtom na antioksidativni potencijal pljuvačke, kao i na njen doprinos oralnoj homeostazi. Predstavljani su ACE inhibitori, lekovi prvog izbora za lečenje esencijalne hipertenzije i hipertenzije udružene sa diabetes melitusom (DM), njihov farmakodinamski i farmakokinetički profil, kao i antihipertenzivni i protektivni efekti primarno u kardiovaskularnim tkivima. Posebno su istaknute oskudne, ne dobro kontrolisane i kontradiktorne studije istraživanja efekata ACE inhibitora na pljuvačne žlezde. Imajući u vidu činjenicu da o elementima angiotenzinskog sistema u pljuvačnim žlezdama čoveka za sada nema podataka, o ovom sistemu kao glavnom mestu delovanja ACE inhibitora i njegovoj interakciji sa elementima NO sistema na nivou drugih tkiva pregledno su predstavljena savremena saznanja. Imajući u vidu dosadašnje nalaze koji se odnose na efekte ACE inhibitora u drugim tkivima u toku hipertenzije i DM, a o čemu za sada nema podataka u kompleksu pljuvačne žlezde – pljuvačka kod ljudi, postavljene su i radne hipoteze ove doktorske disertacije: 1. ACE inhibitori ne prouzrokuju hiposalivaciju i kserostomiju; 2. ACE inhibitori smanjuju oksidativni stres uz povećanje antioksidativnog kapaciteta pljuvačke kod ljudi; 3. U tkivu parotidne žlezde čoveka kao elementi angiotenzinskog sistema prisutni su: angiotenzin konvertirajući enzim (ACE), angiotenzin konvertirajući enzim 2 (ACE2) i receptor za angiotenzin II tip 1 (AT₁ receptor).

Ciljevi istraživanja su precizno definisani: Odrediti protok ukupne nestimulisane pljuvačke (UNP) kod pacijenata na terapiji enalaprilom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba; Utvrditi prisustvo subjektivnog osećaja suvoće usta kod pacijenata na terapiji enalaprilom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba; Odrediti prisustvo i koncentracije ACE i ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre (minimalne koncentracije) i četiri sata posle (maksimalne koncentracije) primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba; Odrediti stepen oksidativnog stresa na nivou lipidne peroksidacije merenjem malondialdehida (MDA) u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba; Odrediti

stepen antioksidativnog kapaciteta merenjem totalnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), koncentracija ukupnog glutationa i aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba; Utvrditi prisustvo komponenti angiotenzinskog sistema u tkivu parotidne pljuvačne žlezde čoveka: ACE, ACE2 i receptor za angiotenzin II tip 1 (AT₁ receptor); Odrediti koncentracije eNOS i iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.

U poglavlju **Materijal i metode** za ovu randomizovanu studiju preseka dati su jasno definisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje ispitanika u studiju, racionalan način randomizacije, kao i statistički određena velika snaga studije (95%). U kliničkim uslovima izvršeno je merenje protoka UNP i utvrđivanje subjektivnog osećaja suvoće usta. Detaljno su opisana laboratorijska ispitivanja sakupljene UNP koja su uključivala imunoesejsku (ELISA) metodu za određivanje koncentracija ACE, ACE2, MDA vezanog za proteine, eNOS i iNOS, i spektrofotometriju za određivanje nivoa TAC, koncentracije ukupnog glutationa i aktivnosti SOD. U tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde određene su imunoesejskom (ELISA) metodom koncentracije ACE, ACE2, AT₁ receptora. U statističkoj obradi podataka navedeni su svi racionalno upotrebljeni statistički testovi.

Rezultati su prikazani u 8 potpoglavlja. Demografske karakteristike učesnika su opisane u prvom potpoglavlju. U drugom potpoglavlju su prikazani učestalost i korelacija kserostomije i stepena salivacije u celoj populaciji. U trećem, četvrtom i petom potpoglavlju su opisani efekti enalapрила na kserostomiju, protok pljuvačke, odnosno oksidativni stres i antioksidativnu zaštitu u pljuvački. Koncentracije ACE i ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački pacijenata na terapiji enalaprilom i zdravih osoba, kao i tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih osoba su prikazane u šestom potpoglavlju, dok su u sedmom prikazane koncentracije AT₁ receptora u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih osoba. U završnom potpoglavlju rezultata su prikazane koncentracije eNOS i iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački pacijenata na terapiji enalaprilom i zdravih osoba.

U **Diskusiji** je naučnom analizom dobijenih rezultata objašnjen izostanak kserogenog efekta (kserostomija i smanjen protok pljuvačke) enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom bez i sa DM tip 2. S posebnom pažnjom analizirano je učešće antihipertenzivnog mehanizma delovanja enalapрила, kao i njegovog protektivnog delovanja, antioksidativnog i interakcija sa

NO sistemom, u njegovim efektima na nivou pljuvačnih žlezda. Istovremeno, dobijeni rezultati su povezani sa nalazima dosadašnjih savremenih istraživanja u ovoj oblasti.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata uobličeni su **Zaključci** koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 421 reference iz savremene i značajne naučne literature koje su adekvatno citirane u radu.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Učestalost kserostomije i protok UNP kod pacijenata sa hipertenzijom na terapiji enalaprilom se ne razlikuje, dok je veća učestalost kserostomije i manji protok UNP kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike. Binarnom logističkom regresionom analizom je pokazano da je DM tip 2 faktor rizika za pojavu, kako kserostomije, tako i smanjenog protoka UNP, u populaciji hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom.

Koncentracije MDA vezanog za proteine, markera lipidne peroksidacije, u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre primene enalapрила su bile slične onima kod zdravih. U UNP 4 sata posle primene enalapрила koncentracije MDA vezanog za proteine su bile značajno niže kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave. Koncentracije TAC – indikatora antioksidativne zaštite, ukupnog glutaciona - komponente neenzimske antioksidativne zaštite, i aktivnost SOD - komponente enzimске antioksidativne zaštite, u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила su bile slične onim kod zdravih. Priliv ukupnog glutaciona u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила je bio sličan onom kod zdravih učesnika, dok je priliv ukupnih antioksidanasa u UNP pacijenata sa hipertenzijom pre i posle primene enalapрила bio sličan onom kod zdravih učesnika, a manji kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2.

Analiza prisustva enzima angiotenzinskog sistema je pokazala da je koncentracija ACE podjednaka u UNP, tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih ljudi, dok je ACE2 prisutan u većim koncentracijama u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde u odnosu na UNP. Komparativna analiza koncentracija ACE i ACE2 pokazuje da su koncentracije ovih enzima u krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih osoba slične, dok je koncentracija ACE bila značajno veća u UNP i značajno manja u tkivu parotidne pljuvačne žlezde u odnosu na ACE2. Koncentracija AT₁ receptora bila je značajno veća u krvnim sudovima parotidne

žlezde nego u žlezdanom tkivu zdravih ispitanika. Kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила koncentracije ACE u UNP su bile slične onim kod zdravih. Nasuprot tome, kod ovih pacijenata koncentracije ACE2 su bile veće u odnosu na zdrave. Koncentracije eNOS u UNP kod pacijenata sa hipertenzijom sa i bez DM tip 2 jedan sat pre primene enalapрила bile su slične kao kod zdravih, dok su 4 sata posle primene enalapрила koncentracije eNOS kod pacijenata sa hipertenzijom su bile slične, a kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 veće u odnosu na one kod zdravih. Koncentracije iNOS u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила su bile slične onima kod zdravih.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove doktorske disertacije, proistekli iz komparativne, randomizovane studije preseka sa statistički potvrđenom snagom studije (95%) pokazali su da enalapril kod pacijenata sa hipertenzijom bez i sa DM tip 2 ne pokazuje kserogeni efekat (kserostomija i smanjen protok pljuvačke). Pregledni radovi koji se odnose na oralne neželjene efekte antihipertenzivnih lekova navode da ACE inhibitori kod kardiovaskularnih pacijenata smanjuju lučenje pljuvačke i prouzrokuju kserostomiju (Saleh i sar, 2015; Scully i Bagan, 2004; Torpet i sar, 2004), iako za sada o tom efektu ACE inhibitora postoje samo prikazi slučajeva i neprecizno randomizovane studije na malom uzorku (Streckfus, 1995; Gislón da Silva, 2004). S druge strane, rezultati ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa velikom kliničkom studijom, na preko 500 kardiovaskularnih pacijenata o oralnim neželjenim efektima kardiovaskularnih lekova gde je pokazano da ACE inhibitori, nasuprot ostalim kardiovaskularnim lekovima, prouzrokuju statistički neznačajnu kserostomiju (Habbab i sar, 2010). Dobijeni rezultat da je kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom zabeležena povećana kserostomija i smanjen protok UNP u odnosu na zdrave učesnike ukazuje više na ulogu DM tip 2 nego enalapрила u nastanku ovog efekta. Ovo stoga što je binarna logistička regresiona analiza pokazala da DM tip 2 predstavlja faktor rizika za pojavu kserostomije i smanjenog protoka UNP.

Imajući u vidu da je glavni farmakodinamski efekat ACE inhibitora inhibicija ACE koja konvertuje angiotenzin I u angiotenzin II (snažan vazokonstriktor) i metaboliše bradikinin (vazodilatator) u ovoj disertaciji analizirani su posebno elementi angiotenzinskog sistema u UNP, tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih ispitanika, kao i u UNP pacijenata sa

hipertenzijom sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom. S obzirom da ACE inhibitori efikasno smanjuju povećanu ekspresiju ACE u hipertenziji (Hara i sar, 2001) rezultati ove doktorske disertacije da nema statistički značajne razlike između koncentracije tkivnog ACE kod zdravih osoba i ACE u pljuvački kod zdravih i hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom pokazuju da enalapril na nivou parotidne žlezde čoveka efikasno smanjuje povećanje ACE izazvano hipertenzijom. S druge strane, farmakokinetička činjenica da je ovaj efekat enalapрила podjednak u njegovim minimalnim i maksimalnim koncentracijama ukazuje da tkivo parotidne žlezde čoveka ima izrazit afinitet i tkivno zadržavanje enalapрила kako je to inače pokazano u farmakokinetičkoj studiji enalapрила u drugim tkivima (Dzau i sar, 2001). Dobijeni rezultati ove doktorske disertacije takođe pokazuju da su AT₁ receptori, više prisutni u krvnim sudovima nego u tkivu parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba gde agonist ovih receptora ostvaruje svoj glavni efekat, vazokonstrikciju, kao u drugim krvnim sudovima (Lin i sar, 2014; Ueda i sar, 2000). Činjenica da nema statistički značajne razlike u koncentraciji ACE u UNP zdravih učesnika i hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom ukazuje da enalapril efikasno inhibiše povećan ACE u hipertenziji (Yang i sar, 2013) i da je nivo angiotenzina II i njegov vazokonstriktorni efekat u parotidnoj žlezdi čoveka smanjen što je jedan od razloga za povećan protok krvi kroz parotidnu žlezdu i izostanak kserogenog efekta enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom, dok je zabeležen kserogeni efekat kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 rezultat same bolesti – DM tip 2, a ne enalapрила.

Činjenica da je koncentracija ACE2 (homolog ACE koji konvertuje vazokonstriktor angiotenzin II u vazodilatatorni peptid angiotenzin (1-7)) u UNP kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom veća u odnosu na zdrave učesnike je u saglasnosti sa nalazom da ACE inhibitori povećavaju ekspresiju i aktivnost ACE2 (Yang i sar, 2013) i direktno pokazuje da su zapažene razlike posledica delovanja enalapрила. Ovi rezultati takođe ukazuju da enalapril efikasno povećava u tkivu parotidne žlezde čoveka angiotenzin (1-7) koji svojom vazodilatacijom doprinosi povećanju protoka krvi kroz parotidnu žlezdu i izostanku kserogenog efekta kod pacijenata sa hipertenzijom, a verovatno i umanjuje kserogeni efekat izazvan DM tip 2. Antioksidativno dejstvo enalapрила, posledica je njegovog indirektnog efekta – smanjeno stvaranje slobodnih radikala i sledstveno smanjen utrošak antioksidanasa, kao i direktnog efekta – povećanje koncentracije i aktivnosti antioksidanasa (neenzimskih i enzimskih) u različitim humanim i tkivima životinja (Donmez i sar, 2002; Deoghare i Kantharia, 2013; de Cavanagh i sar, 2000). Enalapril efikasno smanjuje koncentracije MDA, markera lipidne peroksidacije, u UNP kod pacijenata sa

hipertenzijom sa i bez DM tip 2 u odnosu na zdrave učesnike. Ovaj efekat enalapрила najverovatnije je posledica smanjene koncentracije angiotenzina II koji dovodi do smanjene aktivnosti NADPH oksidaze, smanjene koncentracije slobodnih radikala i sledstvene inhibicije lipidne peroksidacije (Hosomi i sar, 2001; Deoghare i Kantharia, 2013), kao i povećane koncentracije ACE2 u UNP hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom i sledstvenog povećanja angiotenzina (1-7) za koji je pokazano da inhibiše NADPH oksidazu i smanjuje lipidnu peroksidaciju u drugim tkivima (Yousif i sar, 2012). Održavanje TAC pod dejstvom enalapрила zapaženo kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na nivou zdravih najverovatnije se može pripisati njegovom primarnom efektu – inhibicija ACE i sledstvenom smanjenju angiotenzina II i povećanju angiotenzina (1-7) za koje je inače pokazano da prouzrokuju smanjenje aktivnosti NADPH oksidaze i slobodnih radikala (Luque i sar, 1996; Yousif i sar, 2012; Hosomi i sar, 2001). Postojanje pozitivne korelacije između protoka UNP i priliva ukupnih antioksidanasa u celoj populaciji (zdravi i hipertenzivni pacijenti sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom), kao i u okviru populacije hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom ukazuje da je pozitivan efekat enalapрила na ukupni antioksidativni status kod pacijenata sa DM tip 2 smanjen zbog smanjenog protoka pljuvačke. Protektivnom dejstvu enalapрила na nivou UNP kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 doprinosi i održavanje koncentracija ukupnog glutathiona, markera neenzimske antioksidativne zaštite, i aktivnosti SOD, markera enzimske antioksidativne zaštite, na nivou zdravih. Činjenica da je koncentracija eNOS povećana u UNP hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 posle primene enalapрила, ali da je istovremeno u tim uslovima smanjen protok UNP pokazuje da je povećani eNOS u stvari disfunkcionalan jer ne pravi dovoljno NO koji će kao vazodilatator da doprinese izostanku kserogenog efekta kod ove grupe pacijenata. Poznato je inače da je disfunkcija eNOS u DM rezultat povećane aktivacije NADPH oksidaze, produkcije superoksida i smanjene koncentracije dihidrofolat reduktaze (Oak i Cai, 2007; Schumacher i sar, 2011). S druge strane, činjenica da je koncentracija eNOS u UNP hipertenzivnih pacijenata bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom slična kao kod zdravih osoba ukazuje na mogućnost da kod ovih pacijenata enalapril stimulatorno deluje na ekspresiju eNOS na nivou parotidne žlezde kako je to inače pokazano za ACE inhibitore u srcu u toku hipertenzije (Hara i sar, 2001). Poznato je da je u krvnim sudovima i srcu u toku hipertenzije (Ghou i sar, 1998; Hong i sar, 2000) i DM (Nagareddy i sar, 2005) povećana ekspresija iNOS, a u usnoj šupljini u toku hroničnog periodontitisa (Pan i sar, 2010; Shaker i sar, 2013). Rezultati ove doktorske studije da kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom nema značajne razlike u koncentraciji

iNOS u UNP u odnosu na zdrave ukazuju na pretpostavku da enalapril kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 efikasno smanjuje povećanu ekspresiju iNOS izazvanu hipertenzijom i DM, ali ne i onu izazvanu periodontitisom. Ovo stoga što su svi učesnici ove doktorske studije imali hronični periodontitis.

D. Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije

Djukić LJ, Roganović J, Brajović MD, Bokonjić D, Stojić D. The effects of anti-hypertensives and type 2 diabetes on salivary flow and total antioxidant capacity. Oral Dis. 2015;21(5):619-25.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**ACE INHIBITORI, ENALAPRIL, I MEHANIZMI ORALNE HOMEOSTAZE: PROTOK PLJUVAČKE I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA**“ dr Ljiljane Đukić predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u rasvetljavanju mehanizma kojim enalapril, ACE inhibitor, za razliku od većine antihipertenzivnih lekova, ne izazova kserogeni efekat kod pacijenata sa hipertenzijom sa i bez DM tip 2. Rezultati istraživanja jasno ukazuju na doprinos primarnog farmakodinamskog efekta ACE inhibitora – inhibicija ACE i sledstveno smanjenje nivoa vazokonstriktora angiotenzina II, kao i njihovog protektivnog efekta - porast koncentracije ACE2 i sledstveni porast vazodilatatornog angiotenzina (1-7) sa antioksidativnim svojstvima, na održavanje sekretorne funkcije pljuvačnih žlezda u uslovima bolesti, čak i takvih koje smanjuju sekretornu aktivnost pljuvačnih žlezda kao što je to slučaj sa DM tip 2. Time ovi rezultati daju doprinos stomatološkoj kliničkoj farmakologiji sa aspekta protektivnog dejstva ACE inhibitora na sistem pljuvačne žlezde – pljuvačka, kao i osnov za analizu značaja angiotenzinskog sistema u oralnoj homeostazi. Doktorska disertacija dr Ljiljane Đukić urađena je prema svim principima naučnog, kliničkog i eksperimentalnog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličenim zaključcima.

Na osnovu svega napred navedenog, Komisija predlaže Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Ljiljane Đukić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka – stomatologija.

U Beogradu, 05.04.2016. godine

Članovi Komisije

Prof. dr Elena Kršljak
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Milan Brajović
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miroslav Radenković
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu