

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 01.12.2016. godine, broj 5940/8, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Povezanost nivoa leptina i adiponektina sa somatskim i metaboličkim parametrima diskordantnih blizanaca“

kandidata dr Svetlane Milenković, zaposlene u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije u Beogradu, Mentor je Prof. dr Borisav Janković, Komentor je Prof. dr Ljiljana Mirković

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Darko Plećaš, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Silvija Sajić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Svjetlana Maglajlić Đukić, profesor 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 doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Svetlane Milenković napisana je na ukupno 130 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 68 tabela, 28 grafikona i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisan pojam fetalnog programiranja kod intrauterusnog zastoja u rastu (IUZR) i istaknut njegov značaj u patogenezi hroničnih bolesti odraslih. Detaljno je izložen pretpostavljeni mehanizam nastanka fetalnog programiranja. Poseban akcenat je stavljen na povezanost disfunkcije masnog tkiva, metaboličkih poremećaja i fetalnog programiranja.

Takođe je prikazan opsežan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za ulogu leptina i adiponektina u metabolizmu odraslih, adaptaciji na normalnu trudnoću i patološka stanja u trudnoći kao i njihov uticaj na fetalni rast.

Ciljevi rada su precizno definisani. Ciljevi istraživanja su bili da se utvrde nivoi adipokina kod blizanaca sa IUZR na rođenju i u trećem danu života i da se ispita njihov odnos sa somatskim i metaboličkim parametrima.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj trasferzalnoj studiji koja je sprovedena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije. Detaljno je opisan način formiranja grupa blizanaca koje su ispitivane a radilo se o grupama diskordantnih i konkordantnih blizanaca. U istraživanje je uključeno ukupno 78 parova blizanaca. Jasno su naznačeni kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja. Uzorci krvi su sakupljeni iz pupčanika i u trećem danu života i čuvani na -20 do izvođenja RIA analiza. Ova studija odobrena je i od strane Etičkog komiteta Klinike za ginekologiju i akušerstvo, Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve majke čiji su blizanci bili uključeni u istraživanje su detaljno informisane o ciljevima studije i dale su pisani pristanak pre uključenja u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati tabelarno, grafički i tekstualno.

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 247 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ove studije su pokazali da su nivoi leptina i leptina/PTM na rođenju i u trećem danu (d3) bili uporedivi između IUZR blizanaca i njihovih parova sa odgovarajućim rastom (appropriate for gestational age-AGA blizanci). Međutim kada su upoređivani blizanci rođeni posle 35. gestacione nedelje (GN) koncentracije leptina su bile značajno niže kod IUZR blizanaca u d3 ($p=0,011$). Nivoi leptina i L/PTM u d3 su bili značajno viši kod većih diskordantnih u odnosu na veće konkordantne blizance ($p=0,001$ i $p=0,001$) kao i kod IUGR u odnosu na manje konkordantne blizance ($p=0,004$ i $p=0,001$ respektivno). Koncentracije

adiponektina i insulina izmerene na rođenju i u d3 kao i u podgrupi iznad 35 GN nisu se statistički značajno razlikovale između IUZR i AGA blizanaca. Međutim adiponektin/PTM je bio viši kod IUZR blizanaca kako u odnosu na AGA blizance tako i u odnosu na manje konkordantne blizance u oba merenja ($p=0,002$ i $p=0,035$ respektivno unutar parova i $p=0,022$ i $p=0,002$ između parova).

U grupi blizanaca iznad 35GN nivo insulina je bio statistički značajno viši kod IUZR u odnosu na manjeg konkordantnog blizanca u d3 ($p=0,044$). Na rođenju su indeksi G/I i HOMA IR bili uporedivi između grupa dok je TG/HDL bio značajno viši kod IUZR u poređenju sa AGA ($p=0,002$) i manjim konkordantnim blizancima ($p=0,014$). U d3 IUZR blizanci su pokazali nešto niže vrednosti G/I u odnosu na svoje AGA blizance i signifikantno niže vrednosti u odnosu na manje konkordantne blizance ($p=0,031$). HOMA IR u d3 je bio uporediv između grupa. TG/HDL C u d3 je ostao viši kod IUZR u odnosu na AGA blizance ($p=0,008$). Kod IUZR blizanaca HOMA IR, G/I i TG/HDL nisu bili povezani sa nivoom bilo kog adipokina za razliku od većih konkordantnih blizanaca u d3 gde je leptin pozitivno korelirao sa HOMA IR i negativno sa G/I i TG/HDL (marginalno). Kod IUZR blizanaca adiponektin i insulin su pokazali pozitivnu povezanost ($p=0,04$) dok je kod manjih konkordantnih blizanaca ova povezanost inverzna ($p=0,032$).

Postojala je korelacija između leptina, ali ne i adiponektina ili insulina, i PTM ($p=0,033$), TD ($p=0,033$), i obima glave ($p=0,031$) kod IUZR blizanaca.

Kod IUZR blizanaca nivo TG je bio značajno viši ($p=0,003$) dok su nivoi TC ($p=0,029$), HDL C ($p=0,013$) i LDL C ($p=0,033$) bili značajno niži na rođenju. U trećem danu HDL C je bio signifikantno niži ($p=0,004$) a TG su bili viši ($p=0,011$) kod blizanaca sa restrikcijom rasta. U diskordantnoj grupi promene u nivou lipida nisu bile povezane sa adipokinima. Suprotno od njih kod konkordantnih blizanaca na rođenju je insulin inverzno korelirao sa TC ($p=0,003$), HDL C ($p=0,03$) i TG ($p=0,001$) dok je adiponektin bio pozitivno povezan sa TG ($p=0,001$). U trećem danu jedino je zabeležena povezanost između leptina i HDL C kod većeg konkordantnog blizanca ($p=0,003$).

Na rođenju nije bilo polne razlike u nivou leptina, adiponektina i insulina. Adiponektin i insulin su bili značajno viši kod muških blizanaca sa IUZR u d3 ($p=0,019$ i $p=0,02$).

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prema podacima iz dostupne literature nivoi leptina su niži kod terminske novorođenčadi sa IUZR (Chiesa 2008, Bajoria 2007, Maveli 2015, Lee 2016, Martos Moreno 2009) mada ima i autora koji ne nalaze značajnu razliku u nivou leptina između IUZR i AGA novorođenčadi (Mazaki Tovi 2009, Aydin 2015, Kyriakakou 2008). Kako je u većem broju istraživanja uključena novorođenčad rođena u terminu pretpostavka je da se odnos između količine masnog tkiva i koncentracije leptina uspostavlja u kasnijoj gestaciji. Iz tih razloga je odvojeno testirana grupa blizanaca rođena posle navršene 35. gestacione nedelje i u ovoj grupi je nivo leptina bio niži kod blizanaca sa IUZR. Ovaj rezultat govori u prilog teoriji o fetalnom programiranju čija je pretpostavka da su promene nastale in utero permanentne i prisutne na rođenju.

Više vrednosti leptina kod diskordantnih u odnosu na konkordantne blizance, kao i viši odnos leptin/TM kod IUZR u odnosu na manje konkordantne blizance može da ukazuje na izvestan stepen adaptacije kod diskordantnih blizanaca ali i na postojanje relativne leptinske rezistencije u ranom neonatalnom uzrastu što potvrđuju i radovi drugih autora (Davidson 2006, Valuniene 2007). Pad nivoa leptina u prvim danima života registrovan je i u ostalim studijama kao što je i u prikazanom istraživanju (Valuniene 2007, Bellone 2005, Sivan 2003).

Korelacija između leptina i somatskih parametara je registrovana na rođenju i kod IUZR i kod AGA blizanaca što takođe nalazi većina autora (Zheng 2014, Nakano 2009, Martos Moreno 2009, Tung 2009) mada ima i onih koji negiraju ovu povezanost (Orbak 2001, Siahaniidou 2007). Kod IUZR blizanaca nivo leptina nije korelirao sa indirektnim pokazateljima količine masnog tkiva (BMI i PI), za razliku od konkordantnih blizanaca, što ukazuje na poremećen odnos masnog tkiva i leptina kod IUZR.

Kod odraslih je prisutna polna razlika u nivou leptina dok su u prezentovanom istraživanju kod dečaka bile nešto niže vrednosti leptina u svim ispitivanim grupama, ali bez statističke značajnosti. Pretpostavka je da bi na većem uzorku ova razlika imala statističku značajnost kao u radovima nekih istraživača (Briesiada 2014, Mellati 2010, Zheng 2014).

Suprotno leptinu, nivoi adiponektina i insulina na rođenju i u trećem danu bili su uporedivi kod IUZR blizanaca u odnosu na AGA blizance. Podaci iz dostupne literature, posebno vezano za adiponektin su malobrojni i inkonzistentni. Prema nekim objavljenim rezultatima nivoi adiponektina su niži kod IUZR novorođenčadi (Mazaki Tovi 2009, Lee 2016, Visenetin

2014) i koreliraju sa somatskim parametrima (Mantzoros 2009, Saito 2012, Pardo 2004) dok drugi autori ne nalaze razliku u nivou adiponektina kod IUZR na rođenju (Bozzola 2010, Kyriakakou 2008, Martinez Cordero 2006) niti njegovu korelaciju sa somatskim parametrima (Inoue 2008, Pardo 2004, El Mazary 2015, Fonseca 2015). Kako je kod odraslih prisutna inverzna korelacija između količine masnog tkiva i koncentracije adiponektina u serumu izostajanje korelacije između adiponektina i somatskih parametara može ukazati da se već na rođenju počinje uspostavljati negativan uticaj masnog tkiva na sekreciju adiponektina. Ovoj pretpostavci u prilog govore i rezultati ove studije koji su pokazali viši odnos adiponektin/TM kod IUZR blizanaca kako u odnosu na njihove AGA blizance tako i u odnosu na manje konkordantne blizance, što je verovatno posledica manjeg inhibitornog uticaja iz redukovanog masnog tkiva kod IUZR.

Na rođenju su indeksi insulinske senzitivnosti odnosno rezistencije kod IUZR bili nesignifikantno niži što je uporedivo sa nekim podacima iz literature (Bozzola 2010, Hou 2014, Street 2009) dok je u suprotnosti sa rezultatima drugih istraživanja (Beltrand 2008, Zhao 2010). U literaturi ima veoma malo podataka vezano za nivoe insulina i pokazatelje insulinske senzitivnosti u ranom neonatalnom uzrastu. Dok dva autora zaključuju da su novorođenčad sa IUZR senzitivnija na insulin od AGA novorođenčadi u prvim danima života (Bazaes 2003, Mericq 2005)) treći tvrdi upravo suprotno- da su IUZR neonatusi i ranom neonatalnom uzrastu već rezistentni na insulin (Wang 2007). Rezultati prezentovane studije vezani za pokazatelje insulinske senzitivnosti/rezistencije u trećem danu (G/I, HOMA IR i TG/HDL C) ukazuju na postojanje rlativne insulinske rezistencije kod IUZR blizanaca. Kao što je veoma malo podataka prisutno u literaturi vezano za insulinsku senzitivnost kod IUZR novorođenčadi tako je još manje autora prikazalo svoja istraživanja vezana za povezanost adipokina i insulinske senzitivnosti. U našoj studiji nije registrovana povezanost leptina i adiponektina sa insulinskom senzitivnošću kod IUZR blizanaca što potvrđuje mali broj studija koje su se bavile ovim pitanjem (Martos Moreno 2009, Basu 2009). Međutim kod konkordantnih blizanaca u trećem danu postojala je pozitivna povezanost koncentracije leptina sa HOMA IR i inverzna povezanost sa G/I i TG/HDL . Slične rezultate je objavila i nekolicina drugih autora (Zheng 2014, Luo 2013, Catalano 2009). Ovi rezultati sugerišu da bi leptin mogao igrati značajnu ulogu u regulaciji metabolizma u fetalnom i ranom neonatalnom uzrastu. Suprotno očekivanjima adiponektin nije pokazao povezanost sa pokazateljima insulinske senzitivnosti ni kod diskordantnih ni kod konkordantnih blizanaca što takođe potvrđuju i rezultati nekoliko studija (Basu 2009, Luo 2013) ali je registrovana pozitivna

povezanost sa insulinom kod manjih konkordantnih blizanaca kao i u jednoj studiji novijeg datuma (Zheng 2014). Međutim kod IUZR blizanaca povezanost adiponektina i insulina je inverzna što su takođe objavili i drugi malobrojni autori (Pinar 2008, Kotani 2004), mada ima i onih koji ne nalaze nikakvu vezu između nivoa insulina, adiponektina i odlika fetalnog rasta (Basu 2009, Martos Moreno 2009, Lindsay 2004). U svakom slučaju potrebna su dalja istraživanja na ovom polju koja bi dokazala povezanost nivoa adipokina, IUZR i kasnijih metaboličkih poremećaja u životu.

Prema rezultatima izložene studije može se videti da novorođenčad sa IUZR imaju poremećen lipidni status kako na rođenju tako i u trećem danu života. Visoke nivoe triglicerida na rođenju nalazi i većina ostalih autora (Hou 2014, Nayak 2013, Koklu 2006), dok su podaci vezani za ostale elemente lipidnog statusa šaroliki i govore u prilog smanjenog snabdevanja fetusa sa IUZR (Solis Paredes 2016), poremećene funkcije lipoproteinskih receptora u placenti (Wadsack 2007), smanjene produkcije apolipoproteina u jetri (Pecks 2012) i hipoinsulinemije. Broj objavljenih radova koji su ispitivali lipidni status u ranom neonatalnom uzrastu je još manji i u jedinoj studiji sa kojom smo mogli porediti naše rezultate je pokazano da su nivoi triglicerida, ukupnog holesterola i HDL holesterola viši kod SGA novorođenčadi što upućuje na postojanje insulinske rezistencije u ranom neonatalnom uzrastu. Iako je u našoj studiji kod IUZR blizanaca i u trećem danu nivo triglicerida bio povišen, koncentracije HDL holesterola su bile značajno niže što može značiti da novorođenčad sa fetalnom restrikcijom rasta mogu biti predisponirana kako za dislipidemiju tako i za veći rizik od kardiovaskularnih bolesti u kasnijem životu.

Poremećen nivo lipida kod blizanaca sa IUZR nije bio povezan sa nivoom adipokina. Međutim povezanost adipokina i elemenata lipidnog statusa je registrovana kod konkordantnih blizanaca kako na rođenju tako i u ranom neonatalnom uzrastu (leptin- HDL C, adiponektin-trigliceridi) i delimično je u saglasnosti sa krajnje oskudnim literaturnim podacima (Nelson 2007, Bansal 2006, Nakano 2009) što takođe ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima u ovoj oblasti.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

*Svetlana Milenković, Borisav Janković, Ljiljana Mirković, Miljana Jovandarić, Dušan Milenković, Biljana Otašević. **Lipids and adipokines in cord blood and at 72h in discordant dichorionic twins.** Fetal and Pediatric Pathology (2016). doi:10.1080/15513815.2016.1242675*

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Povezanost nivoa leptina i adiponektina sa somatskim i metaboličkim parametrima diskordantnih blizanaca“ dr Svetlane Milenković, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama fetalnog programiranja. Rezultati studije su pokazali da je kod novorođenčadi sa fetalnom restrikcijom rasta nivo leptina niži i da je povezan sa somatskim parametrima. Takođe je kod novorođenčadi sa IUZR izmenjen nivo lipida već na rođenju. Ovo su dokazi koji govore u prilog teoriji o fetalnom programiranju. Povezanost između leptina, insulina i indeksa insulinske rezistencije kod konkordantnih blizanaca upućuje na zaključak da bi leptin mogao biti važan metabolički marker fetalnog i ranog neonatalnog rasta i razvoja. Mada u studiji nije dokazana povezanost adiponektina sa somatskim i metaboličkim parametrima kod blizanaca sa IUZR to ne isključuje njegovu ulogu fetalnom rastu i metabolizmu što su potvrdili rezultati vezani za konkordantne blizance. Korelacija između leptina, adiponektina i insulina sa lipidnim statusom kod konkordantnih blizanaca ukazuje na potrebu za daljim istraživanjem u ovoj oblasti.

Rezultati ove studije su još jedan od dokaza koji govore u prilog teoriji o fetalnom programiranju apetita te zbog toga mogu imati i praktični značaj. Hipoleptinemija kod dece sa IUZR dovodi do povećanog apetita, koji udružen sa većom insulinskom senzitivnošću u ranom uzrastu dovodi do hiperfagije, ubrzanog rasta, nakupljanja masti i razvoja centralnog tipa gojaznosti a kasnije i dijabetesa. Primena leptina u prvim godinama života mogla bi uticati na smanjivanje incidence gojaznosti i metaboličkog sindroma što je pokazano i u eksperimentalnim studijama.

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 Svetlane Milenković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.12.2016. god..

Članovi Komisije:

Prof. dr Darko Plećaš

Prof. dr Silvija Sajić

Prof. dr Svjetlana Maglajlić Đukić

Mentor:

Prof. dr Borisav Janković

Komentor

Prof. dr Ljiljana Mirković
