

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЛЕНА	05.12.17
Српска	
05	14647/4-4

**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-1032/24 од 08.11.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Маријане Томић-Смиљанић** под називом:

**“Утицај генетских варијанти ензима метаболизма масних киселина на њихов ефекат код пацијената са реуматоидним артритисом“**

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Доц. др Мирјана Веселиновић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, председник;
2. **Др Соња Павловић**, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетско инжењерство Универзитета у Београду, члан;
3. **Проф. др Милан Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

Кандидат **Маријана Томић-Смиљанић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

## 2.1. Кратка биографија кандидата

Маријана Томић-Смиљанић је завршила Медицински факултет Универзитета у Београду у периоду од 1993. до 2000. године са просечном оценом 8,86. 2011. године је уписала специјалистичке студије на Медицинском факултету Универзитета у Београду, смер - општа медицина, које је завршила 2015. године са одличном оценом. Од 2000. године ради у Дому здравља „Раковица“, где је 2015. године именована на функцију начелника опште медицине. Члан је Српског лекарског друштва и Лекарске коморе Србије. Удата је и мајка једног детета.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** “Утицај генетских варијанти ензима метаболизма масних киселина на њихов ефекат код пацијената са реуматоидним артритисом “

**Предмет:** Испитивање ефеката генских варијанти у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.

### **Хипотезе:**

Присуство различитих генских варијанти гена који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина је повезана са различитим клиничким ефектима суплементације концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама и омега -6 масним киселинама код пацијената са реуматоидним артритисом.

## 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Маријана Томић-Смиљанић, је објавила рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

Tomic-Smiljanic M, Radonjic V, Djuric D. Evaluation of antibiotic consumption at Rakovica community health center in period from 2011 to 2015. Serb J Exp Clin Res. DOI: 10.1515/SJECR-2016-0063. M51

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Реуматоидни артритис је хронично обољење где инфламација узрокује бол, оток и деформацију зглобова, најчешће шака и стопала. Процењује се да 1% светске популације болује од ове болести која утиче на квалитет живота таквих болесника.

Међу кључним медијаторима инфламације су еикосаноид Е2 и леукотриен В4, који се стварају из  $n-6$  полинезасићених масних киселина (PUFA) арахидонске киселине (AA; $20:4n-6$ ). Такође су значајни цитокини, интерлеукин  $1\beta$  и фактор туморске некрозе алфа, за које је показано да имају кључну улогу у патогенези реуматоидног артритиса.

Омега-3 масне киселине су есенцијалне масне киселине (не синтетишу се у организму већ се уносе храном). Имају кључну улогу у нормалном расту и развоју, могу смањити ризик од срчаних болести и важне су за когнитивни развој и понашање. Најважније су докозахексаенска (DHA) и еикозапентаенска киселина (EPA). EPA компетативно инхибира претварање арахидонске киселине у проинфламаторне еикосаноиде простагландин Е2 и леукотријен В4. Што се тиче инфламаторних цитокина интерлеукина  $1\beta$  и фактора туморске некрозе алфа, у студијама код здравих добровољаца и код оболелих од реуматоидног артритиса је доказано да се након суплементације омега-3 масним киселинама концентрација смањивала до 90%. Антмиинфламаторни ефекат омега-3 масних киселина је повезан са инхибицијом активности Т лимфоцита и инхибицијом катаболичких ензима.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у потенцијалним новим сазнањима о патофизиологији реуматоидног артритиса и ефектима суплементације омега-3 и омега-6 масним киселинама. Циљ ове студије би било процењивње улоге генских варијанти у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина у модификацији ефекта суплементације омега-3 и омега-6 масним киселинама код пацијената са реуматоидним артритисом. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Анализа генских варијанти rs174556 (интронски регион FADS1 гена, варијанта C>T) у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом;
2. Анализа генских варијанти rs174561 (промоторски регион, и место везивања транскрипционих фактора FADS1 гена, CpG острвце, варијанта C>T) у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом;
3. Анализа генских варијанти rs3834458 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена, CpG острвце, варијанта T>del), у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом;
4. Анализа генских варијанти rs174570 (интронски регион FADS2 гена, место везивања транскрипционих фактора, варијанта C>T), у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом;
5. Анализа генских варијанти rs968567 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена и место везивања транскрипционих фактора, CpG острвце, варијанта G>A) у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Бројна истраживања су доказала да омега-3 масне киселине утичу на активност и симптоме реуматоидног артритиса укључујући болове и отоке зглобова и јутарњу укоченост. Суплементација рибљим уљем код болесника са реуматоидним артритисом је у студијама изазвала и значајно смањење обољевања од кардиоваскуларних болести. Докази указују да различити генотипови могу имати велику улогу у метаболизму масних киселина и да одређују њихов клинички ефекат. Одређивање генских варијанти за гене које кодирају ензиме у метаболизму омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са хроничном инфламацијом који узимају суплементацију омега-3 и омега-6 масним киселинама потребно је ради процене клиничког ефекта на активност болести и превенцију кардиоваскуларног ризика.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Реч је о интервентној, клиничкој, проспективној студији у трајању од 3 месеца.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

Планирано истраживање би обухватило шездесет пацијената са реуматоидним артритисом који су на редовној реуматолошкој терапији и контролну групу од двадесет здравих добровољаца. Укључујући критеријуми за прву испитивану групу ће бити: женски пол, старост испитаница  $\geq 18$  година, постављена дијагноза реуматоидног артритиса на основу American College of Rheumatology (ACR) класификационих критеријума из 2010 год., дужина трајања болести 60-180 месеци, умерено активна болест ( $3.2 < \text{DAS28 скор} > 5.1$ ), терапија Метотрексатом per os у дози од 10-25mg једном недељно и фолном киселином у дози од 10 mg једном недељно и терапија нестероидним антиинфламаторним лековима у стандардним терапијским дозама. Уколико пацијенти већ користе гликокортикоиде per os морају бити на стабилној дози Преднизолонa или еквивалента  $\leq 10$  mg дневно у току трајања студије, као и месец дана пре укључења у студију. Уколико пацијенти тренутно нису на терапији гликокортикоидима, не смеју примити гликокортикоиде (депо препарате или per os) месеца дана пре укључења у студију. Свим пацијентима ће бити примењен терапијски режим са константним дозирањем метотрексатом у току студије, као и два месеца пре укључења у студију и константна доза нестероидних антиинфламаторних лекова у току студије и месеца дана пре укључења у студију. Сви пацијенти ће потписати информисани пристанак, што подразумева да ће сви бити упознати са протоколим истраживања и процедурама које се користе у студији и добровољно ће пристати да учествују у њима, као и да их се придржавају. Искључујући критеријуми за групу пацијената са реуматоидним артритисом ће бити: трудноћа, лактација, старост  $< 18$  година, анамнестички податак или актуелно присуство других хроничних обољења изузев реуматоидног артритиса као што су: хронична ренална инсуфицијенција, хронични пијелонефритис, малигне болести, хиперлипидемија, обољења јетре, diabetes mellitus, остале ендокринопатије, коронарна болест, употреба антикоагулантне и антиагрегационе терапије, срчана инсуфицијенција, неконтролисана артеријска хипертензија,

гастроинтестинална, пулмолошка и неуролошка обољења, друге системске болести везивног ткива или други артритиси, утврђен дефицит фолне киселине, или витамина В6 и В12, психијатријски поремећаји, злоупотреба лекова или алкохола, пацијенти са реуматоидним артритисом који су на биолошкој терапији или терапији другим синтетичким лековима који мењају ток болести (Лефлуномид, Сулфасалазин, соли злата, антималарици), присуство акутних инфекција. Критеријуми за укључење у контролну групу здравих појединаца ће бити: женски пол, старост испитаника  $\geq 18$  година, подударне старосне структуре са испитиваном групом болесника, осуство акутних и хроничних обољења као што су: болести бубрега, хиперлипидемија, обољења јетре, diabetes mellitus, остале ендокринопатије, коронарна болест, срчана инсуфицијенција, артеријска хипертензија, малигне болести, хематолошка, гастроинтестинална, пулмолошка, неуролошка и психијатријска обољења, системске болести везивног ткива и акутни хронични артритиси, инфекције.

Група од четрдест пацијената са реуматоидним артритисом би у контролисаној студији у трајању од 3 месеца узимала суплементацију масним киселинама. Двадесет пацијената би узимало свакодневно након оброка 5 гел капсула Omega-3 Kardio®, која у саставу једне гел капсуле садржи: 1000 mg концентрованог риблињег уља са 300 mg докозахексаенске киселине (DHA), 200 mg еикозапентаенске киселине (EPA), 100 mg осталих омега-3 масних киселина, током три месеца уз своју редовну реуматолошку терапију. Других двадесет пацијената би свакодневно узимало након оброка 2 гел капсуле Omega-3 Kardio® и 2 гел капсуле уља ноћурка које у саставу једне капсуле садрже 1300 mg уља ноћурка са 949 mg линоленске киселине и 117 mg гама-линоленске киселине (gamma linolenic acid - GLA), током три месеца уз своју редовну реуматолошку терапију. За разлику од тога група од двадесет пацијената са реуматоидним артритисом би била само на својој редовној реуматолошкој терапији и не би узимала суплементе.

Контролна група би се састојала од 20 здравих испитаника сличних година старости и пола, који нису узимали суплементацију омега-3 и омега-6 масним киселинама.

Студија ће се спроводити у Дневној болници Одељења реуматологије Клиничког центра Крагујевац и трајаће  $93 \pm 7$  дана, са почетком од јануара 2018. год.

### 2.7.3. Узорковање

Свим испитаницима ће се узимати анамнеза и обавити физикални преглед, као и мерење антропометријских мера у Дневној болници Одељења реуматологије Клиничког центра Крагујевац. Анализе крви би се узимале након физикалног прегледа у јутарњим часовима.

### 2.7.4. Варијабле

Свим пацијентима са реуматоидним артритисом, као и испитаницима у здравој контролној групи биће одређене генетске варијанте гена који кодирају ензиме метаболизма омега-3 и омега-6 масних киселина. За анализу генских варијанти биће коришћена методологја заснована на PCR-у (PCR-RFLP и алел-специфични PCR) као и сквенцирање по *Sanger*-у. Анализа ће се радити у Лабораторији за молекуларну биомедицину у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Биће анализирани следеће генске варијанте: rs174556 (интронски регион FADS1 гена, варијанта C>T), rs174561 (промоторски регион, и место везивања транскрипционих фактора FADS1 гена, CpG острвце, варијанта C>T), rs3834458 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена, CpG острвце, варијанта T>del), rs174570 (интронски регион FADS2 гена, место везивања транскрипционих фактора, варијанта C>T) и rs968567 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена и место везивања транскрипционих фактора, CpG острвце, варијанта G>A).

Одређивање нивоа масних киселина у серуму у контролној групи здравих особа, као и у групи болесника са реуматоидним артритисом вршиће се у Центру за истраживања изврности у исхрани и метаболизму Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду. Код испитаника са реуматоидним артритисом одређиваће се нивои масних киселина у серуму на почетку и на крају студије.

Свим пацијентима у испитиваној групи са реуматоидним артритисом ће се процењивати активност болести преко DAS 28 скорa на почетку студије и после три месеца. За израчунавање DAS 28 скорa се користе параметри - број осетљивих зглобова, број отечених зглобова, вредност седиментације еритроцита и пацијентова процена бола преко VAS скале бола. Јачина бола се градира 0 mm - без бола, а интензивнији бол се обележава са већим бројем на милиметарској скали, најјачи бол се градира са 100 mm - десна страна линије. Вредност DAS 28 скорa се израчунава путем калкулатора на сајту

*www.umcn.nl.DAS28*. Квалитет живота пацијента ће се процењивати упитником о квалитету живота код пацијенета са реуматоидним артритисом (HAQ -Health Assessment Questionnaire) на почетку студије и након три месеца.

Одрђиваће се антропометријске мере: телесна висина, телесна маса, индекс телесне масе, обим струка, проценат масног ткива (FAT %), сагитални абдоминални дијаметар (SAD).

Свим испитиваним пацијентима као и здравим особама из контролне групе ће се одређивати С реактивни протеин (нефелометријом), седиментација еритроцита (*Westergreen* методом), комплетна крвна слика, липидограм ензимским есеј китом (Roche Pharmaceuticals). Свим испитиваним пацијентима са реуматоидним артритисом ће се одређивати реуматоидни фактор (техника *Latex* аглутинације), антитела на циклични цитрулисани пептид (Diastat kit (Axis-Shield Diagnostics, Dundee, UK)) у Централној лабораторији Клиничког Центра Крагујевац.

У лабораторији Факултета медицинских наука у прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријским методама ће се свим испитиваним пацијентима са реуматоидним артритисом одређивати следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анион радикал ( $\text{O}_2^-$ ), и водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), и цитокини (TNF-alfa, IL1, 2, 6, 17).

### **2.7.5. Снага студије и величина узорка**

Прорачун укупног узорка је заснован на литературним подацима. За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма.

Прорачун студијског узорка је заснован на подацима о вредностима примарног исхода, степена активности болести (DAS 28) инструмента клиничке процене и очекиваног ефекта суплементације на активност болести. На основу раније студије је претпостављени скор DAS 28 од 5.75 са око 20% стандардне девијације одн. 1.15 а очекивани ефекат суплементације је умерен, са активношћу DAS 28 скором од 4.75 и стандардном девијацијом 0.95. При томе је коришћен компјутерски програм PC Sample Size и статистички тест за примарну варијаблу, за *t*-тест два независна узорка, са алфа грешком од 5% и снагом студије од 80%, алокацијом 1:1 је израчунат најмањи узорак од



18 испитаника по групи. Узорак је увећан за претпоставку непараметријске расподеле тако да је минимални укупан студијски узорак утврђен на 50 испитаника, у једној групи 30 а у другој 20 испитаника.

#### 2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка обрада експерименталних података ће се обављати на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.
- 4) Статистичка обрада података ће се радити у статистичком пакету *SPSS 18.0 for Windows*.

#### 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали суплементацију концентрованог рибљег уља са омега-3 масним киселинама и препарат уља ноћурка имаће различите клиничке бенефите суплементације. Докази указују да различити генотипови могу имати знатну улогу у метаболизму масних киселина и да одређују њихов клинички ефекат.

#### 2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Одређивање генских варијанти за гене које кодирају ензиме у метаболизму омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са хроничном инфламацијом могу да одреде

адекватну дозу, као и врсту суплементације ради одговарајућег клиничког и превентивног дејства.

### 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф др Александра Томић Лучић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина.

Проф др Александра Томић Лучић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

#### 3.1 Компетентност ментора

Радови проф др Александре Томић Лучић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Veselinovic M, Vasiljevic D, Vucic V, Arsic A, Petrovic S, **Tomic-Lucic A**, Savic M, Zivanovic S, Stojic V, Jakovljevic V. Clinical Benefits of n-3 PUFA and  $\alpha$ -Linolenic Acid in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Nutrients*. 2017; 9(4). pii: E325.
2. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M, Zivkovic V, **Tomic-Lucic A**, Djuric D, Jakovljevic V. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem*. 2014; 391(1-2):225-32.
3. **Tomic-Lucic A**, Petrovic R, Radak-Perovic M, Milovanovic D, Milovanovic J, Zivanovic S, Pantovic S, Veselinovic M. Late-onset systemic lupus erythematosus: clinical features, course, and prognosis. *Clin Rheumatol*. 2013; 32(7):1053-8.
4. **Tomić-Lucić AP**, Pantović SB, Rosić GL, Obradović ZM, Rosić MA. Histamine index and clinical expression of rheumatoid arthritis activity. *Vojnosanit Pregl*. 2010; 67(4): 286-90.

#### 4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином

## 5. Научна област чланова комисије

1. **Доц. др Мирјана Веселиновић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, председник;
2. **Др Соња Павловић**, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетско инжењерство Универзитета у Београду, члан;
3. **Проф. др Милан Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Маријана Томић-Смиљанић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Маријане Томић-Смиљанић, уз корекцију наслова, тако да гласи: **“Утицај генских варијанти ензима метаболизма масних киселина код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса“** и одобри њену израду.

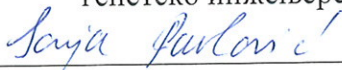
### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

**Доц. др Мирјана Веселиновић**, доцент Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*,  
председник;



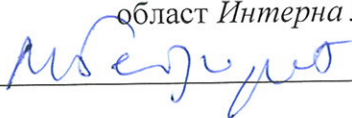
---

**Др Соња Павловић**, научни саветник Института за молекуларну генетику и  
генетско инжењерство Универзитета у Београду, члан;



---

**Проф. др Милан Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета  
Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну  
област *Интерна медицина*, члан;



---

У Крагујевцу, 16.11.2017. године