

**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ**

**1. Одлука Наставно- научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Наставно- научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-10274/3-3 од 28.11.2012. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата дипл. фарм. Оливере Миловановић под називом:

**„ Популациона фармакокинетика 25-хидроки витамина Д код студената”**

На основу одлуке Наставно- научног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација, председник
2. Доц. др Јасмина Миловановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија са токсикологијом, члан
3. Доц. др Радмила Величковић- Радовановић, доцент Медицинског факултета, одсек фармације, Универзитета у Нишу, за ужу научну област Клиничка фармакологија, члан

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

**2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

Кандидаткиња, дипл. фарм. Оливера Миловановић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

**2.1 Кратка биографија кандидата**

Дипл. фарм. Оливера Миловановић је рођена 09.08.1986. год. у Крагујевцу. Средњу школу Прву крагујевачку гимназију завршила у Крагујевцу. Дипломирала је на смеру Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету Универзитета у

Крагујевцу 2009. год. са просечном оценом 9.40. Обавила стаж предвиђен за дипломираног фармацеута и положила стручни испит. Током основних студија била је стипендиста Министарства просвете Републике Србије као и Министарства омладине и спорта Републике Србије. Од 2010. год. до данас запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у звању асистента за ужу научну област Клиничка фармација. Студент је Академских докторских студија Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје: молекулска медицина– клиничка и експериментална фармакологија. Усмени докторски испит положила је у септембру 2011. године.

## **2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе**

**Наслов: „ Популациона фармакокинетика 25-хидрокси витамина Д код студената”**

### **Предмет:**

Ова студија се бави изградом популационог фармакокинетског модела 25- хидрокси витамина Д код студената, тј. добијањем средњих популационих вредности клиренса и волумена дистрибуције 25- хидрокси витамина Д код студената као и идентификовањем и квантификацијом фактора који утичу на наведене параметре. Поред наведеног, студија ће испитивати корелацију серумске концентрације 25- хидрокси витамина Д са постугнутим успехом на студијама.

### **Хипотезе:**

1. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и оствареног успеха учења код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
2. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и анксиозности код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
3. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и депресивности код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
4. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и когниције (мишљена и меморије) код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
5. Начин исхране повезан је са настанком хипо- или хипервитаминозе код испитиване популације.
6. Временски период изложености сунчевој светлости повезан је са настанком хипо или хипервитаминозе код испитиване популације.

### 2.3 Подобност кандидата

Кандидат је је испунио услов за пријаву докторске тезе – објавила је рад у целини у домаћем часопису са рецензијом, у коме је први аутор:

1. Миловановић О. Приказ најчешће прописиваних антихипертензива у општој пракси. Рационална терапија 2010; 2(2): 1-6. (Није категорисан - 0 бодова).

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Витамин Д је липосолубилни витамин који је присутан у више хемијских облика од којих су за човека најзначајнији Д<sub>2</sub> (ергокалциферол) - добија се из хране, и Д<sub>3</sub> (холекалциферол) - ствара се у кожи. Обе форме витамина Д (Д<sub>2</sub> и Д<sub>3</sub>) су неактивне и морају проћи две реакције хидроксилације да би настала активна форма којом се остварају физиолошки ефекти у организму. Већински део витамина Д (80-90%) се синтетише у кожи под дејством сунчеве светлости односно УВ зрака из 7-дехидрохолестерола, док се преостали део (10-20%) уноси путем хране или суплемената. Улога витамина Д може се представити широким спектром физиолошких функција од регулације хомеостазе калцијума и фосфора у садејству са паратхормоном, преко минерализације костију, повећања пролиферације и диференцијације мишићних ћелија, дејства на срце кроз регулисање хомеостазе калцијума, имуномодулаторног дејства која остварује кроз пролиферацију, диференцијацију и апоптозу Т и Б лимфоцита, смањење стварања масног ткива, позитивног утицаја на контролу гликемије, као и позитивног дејства на обољења ЦНС-а, као што су депресија и поремећаји когнитивне функције. Терапијски распон серумске концентрације витамина Д (тј. његовог облика 25-хидрокси витамина Д на основу кога се врши процена) се креће у опсегу од 75-125 nmol/l (30-50mg/l), а оптимална серумска концентрација за овај витамин износи 80 nmol/l. Одступање од наведених вредности може се испољити као хипо- или хипервитаминоза витамина Д. Развоју хиповитаминозе доприноси велики број фактора (поремећаји исхране, стил живота, фототип коже, присуство бубрежних или обољења јетре, поремећаји дигестивног тракта, присуство генетичког полиморфизма ВДР рецептора, место боравка особе односно географско подручје, годишње доба, доба дана, присуство облачности и индустријских загађивача у животном окружењу, хронична употреба лекова као што су као што су антиепилептици, антациди, антихиперлипидемици (холестирамин), кортикостероиди, диуретици, орлистат. Оптимална серумска концентрација витамина Д може се постићи узимањем хране богате витамином Д као и адекватним излагањем сунчевој светлости, или суплементацијом неведеног витамина.

## 2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

### Циљеви

Примарни циљеви ове студије су:

1. Одређивање средњих, популационих вредности фармакокинетичких параметара (клиренса и волумена дистрибуције) 25-хидрокси витамина Д у популацији младих, здравих испитаника у Србији, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
2. Развијање популационог фармакокинетичког модела клиренса витамина Д и откривање и квантификација фактора који у значајној мери утичу на клиренс и интра- и интериндивидуалну варијабилност 25-хидрокси витамина Д у популацији младих, здравих испитаника у Србији, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
3. Испитивање корелације серумских концентрација витамина Д у популацији младих, здравих испитаника у Србији, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу са постигнутим успехом на студијама, тј. просечном оценом оствареном током дотадашњег студирања.
4. Процена анксиозности, депресије, као и мишљења и меморије код испитиване популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу и утврђивање њихове повезаности са измереном серумском концентрацијом витамина Д у испитиваној популацији.

### Значај

Добијањем одговарајуће фармакокинетске једначине клиренса и његове варијабилности могуће је предвидети дозу витамина Д за сваког појединачног испитаника што значајно утиче на индивидуализацију дозног режима витамина Д код људи. Такође испитивање постојања корелације серумске концентрације витамина Д са постигнутим успехом током студирања, меморијом, мишљењем, анксиозношћу и депресијом може указати на потребу за суплементацијом витамина Д у студентској популацији. Студија овог типа би била прва студија у Србији.

## 2.6. Веза са досадашњим истраживањима

Према досадашњим истраживањима у свету има око 1 милијарда људи који имају неки облик хиповитаминозе, тј. инсуфицијенцију (серумска концентрација 25-хидрокси витамина Д у распону 50-70 nmol/l (20-28 mg/l)) или дефицијенцију (серумска концентрација 25-хидрокси витамина < 50 nmol/l (< 20 mg/l)), витамина Д.

Постојеће студије указују на то да је преваленца дефицита витамина Д значајно виша код становника Европе у односу на становнике Азије, Аустралије и САД-а. Ова појава се поред различите распрострањености фактора ризика за настанак дефицита витамина у наведеним земљама може објаснити постојањем програма обогаћивања хранљивих намирница у САД док је у Европи тренд обогаћивања намирница витамином Д још увек у почетној фази развоја, тако да се у Србији налази свега неколико намирница

обогаћених овим витамином. Такође је запажено да се хиповитаминоза јавља код оба пола, у свим старосним групама независно од етничке припадности. Присутни подаци указују да развој дефицијенције витамина Д има епидемијске размере у већини старосних група али се због савременог начина живота и присутних фактора ризика то посебно рефлектује на децу и одрасле особе, што последично доводи до развоја рахитиса код деце а остеомалације код одраслих.

Поред ранијих студија које су показале есенцијалну повезаност витамина Д и скелетног система, запажа се присуство све већег броја проспективних и ретроспективних истраживања која указују на значај ниске вредности серумске концентрације 25- хидрокси витамина Д при развоју нескелетних болести као што су канцер колоне, простате, груди, ендометријума, коже, костију, плућа и других обољења попут мултипле склерозе, системског лупуса, реуматоидног артритиса, дијабетеса, хипертензије, психијатријских и неуролошких обољења, псоријазе, инфекција итд.

Бројне епидемиолошке студије су испитивале повезаност серумске концентрације витамина Д са когнитивним функцијама, функционалним оштећењима и обољењима као што су депресија, деменција и Алцхајмерова болест. Досадашње студије спровођене на студенској популацији су показале контраверзне ставове истраживача о повезаности серумске концентрације витамина Д са когнитивним функцијама, стога се може изнети потреба за спровођењем контролисаних студија са наведеном тематиком.

Појава хипервитаминозе је ретка и настаје услед претеране, хроничне суплементације витамином Д.

## **2.7. Методе истраживања**

### **Врста студије**

Истраживање ће бити спроведено као проспективна студија типа „серије случајева“.

### **Популација која се истражује**

Популација испитаника се састоји од здравих добровољаца из групе студената Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, старости од 19 до 30 година. Испитаници ће бити укључени у студију на основу добровољног пристанка, упознавања са студијом усменим и писменим путем, и након потписивања формулара за Информативни пристанак испитаника. Временски период посматрања испитаника ће бити месец дана. Током наведеног периода испитаници ће уредно водити Дневник исхране где ће за сваки дан уносити податке о врсти, количини и времену уношења намирница у току сваког дана као и податке о временском периоду изложености сунчевој светлости у току појединачног дана (временски период ће бити изражаван као број минута у току дана), на основу чега би се рачунала доза витамина Д унета у организам за наведени период.

Истраживач ће водити евиденцију о временским приликама за посматрани период тј бележиће се да ли је дан сунчан или је присутна облачност.

## Узорковање

Испитаници који ће бити укључени у студију мораће да испуњавају следеће критеријуме: да су здрави, да су старости од 19 до 30 година, да су на избалансираној исхрани, да нису мењали стил исхране у току последњих 6 месеци и да добровољно прихватају учешће у студији. Искључујући критеријуми ће бити: конзумација витаминских суплемената или олигоелемената, дијететски режим исхране, терапија анаболицима тј. допинг средствима, терапија хормонским препаратима, обољења јетре или бубрега, хронично обољење, трудноћа и дојење, самоиницијативно прекидање учешћа у студији.

Након завршетка вођења дневника исхране од пацијената ће у јутарњим сатима (пре оброка) бити узето 20 мл крви венепункцијом. Узета крв ће бити расподељена у три епрувете. Две епрувете са по 7 ml пуне крви, од којих ће једна епрувета садржати антикоагуланс ЕДТА, ће бити центрифугиране 10 минута на 3000 обртаја након чега ће бити издвојена плазма односно серум за ХПЛЦ и хормонску анализу и који ће се чувати у замрзивачу на  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализе. Трећа епрувета са 6 ml пуне крви ће бити послата на биохемијску анализу при чему ће се одређивати следећи параметри: ниво урее, креатинина, тоталних протеина, калцијума и неорганских фосфата. Хормонска анализа ће обухватати одређивање нивоа паратиреодног хормона (ПТХ), слободног тироксина (ФТ4), слободног тријодтиронина (ФТ3), антитела на тиреоидну пероксидазу (анти-ТПО), тиреокалцитонина (ТЦТ). Поступак вађења крви ће се спроводити у Одељењу за ендокринологију Интерне клинике Клиничког центра у Крагујевцу од стране стручног медицинског особља, док ће се хормонске анализе одређивати у Центру за нуклеарну медицину, Клиничког центра у Крагујевцу. Сваки узорак крви узет од испитаника ће бити обележен шифром у циљу поштовања њихове приватности.

Мерење концентрације витамина Д односно његовог 25, хидрокси метаболита (на основу кога се процењује статус односно концентрација витамина Д код човека) ће бити извршена помоћу ХПЛЦ методе у фармакокинетичкој лабораторији Катедре за фармакологију и токсикологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу, коришћењем комерцијалног кита за његово одређивање од добављача ХЕМТЕК, Београд. Претходно ће бити извршена екстракција витамина Д из плазме.

Екстракција 25- хидрокси витамина Д се изводи са преципитационим реагенсом који је комерцијално доступан (број 38005) од поменутог добављача. Запремина узорка која се ињектује у систем је 50 микролитара, док се сепарација врши на аналитичкој колони (број 38100) уз брзину протока мобилне фазе од 1,6 мл/мин. Таласна дужина за детекцију 265 нанометара на собној температури. На основу калибрационе криве конструисане на основу познатих концентрација 25- хидрокси витамина Д (у распону њене линеарности) одређује се концентрација 25- хидрокси витамина Д у узорцима плазме.

## Инструменти:

- Цунгова скала за самопроцену анксиозности (Zung Self- Rating Anxiety Scale)
- Цунгова скала за самопроцену депресивности (Zung Self-Rating Depression Scale)
- Бекова скала за самопроцену депресивности (Beck Depression Inventory)
- Бекова скала за самопроцену анксиозности (Beck Anxiety Inventory)

- Тест самопроцене меморијског функционисања (Memory Functioning Questionnaire)
- Краткопреносиви меморијски тест (The Short Portable Mental Status Questionnaire-SMPQ)
- Монтреалски тест когниције (Montreal Cognitive Assessment – MoCA)
- Тест лица

Сви поменути инструменти су слободни за коришћење осим Монтреалског теста когниције за који је добијена дозвола за коришћење.

## **Варијабле које се мере у студији**

### **Независне варијабле:**

- Доза и дозни режим витамина Д– који ће бити добијени анализирањем дневних obroka и изложености сунчевим зрацима током периода посматрања. Садржај витамина Д у оброцима у случају готових производа биће одређиван на основу декларацијских података о садржају витамина Д у одређеној количини производа, док ће садржај витамина Д у другим намирницама коришћеним у исхрани бити прерачунат на основу табела USDA National Nutrient Database for Standard reference, Release 24; Vitamin D Content of Selected Foods per Common Measure. Изложеност сунчевим зрацима у трајању од 5 до 10 минута (при чему се излаже 25% укупне површине тела) ствара 3000 IU витамина Д. Присуство велике облачности редукује УВБ зрачење и синтезу витамина Д за 99% .

### **Зависне варијабле:**

- Серумска концентрација витамина Д у испитиваној популацији- добијена ХПЛЦ анализом
- Средња популациона вредност фармакокинетских параметара (клиренс и волумен дистрибуције) витамина Д- добијена помоћу софтверског пакета НОНМЕМ (Нелинеарно Комбиновање Мешовитих Ефеката)
- Анксиозност- процењује се применом Цунгове и Бекове скале за самопроцену анксиозности
- Депресивност- процењује се применом Цунгове и Бекове скале за самопроцену депресивности
- Когнитивне функције (меморија, мишљење)- процењује се применом Теста меморијског функционисања, Монтреалског когнитивног теста и Теста лица.

### **Збуњујуће варијабле:**

- Старост, пол, етничка припадност, телесна тежина и висина испитаника, индекс телесне масе (БМИ)- Подаци ће бити добијени помоћу посебно осмишљеног упитника.
- Просечна дневна количина конзумирања кафе, цигарета и алкохола- Подаци ће бити добијени помоћу посебно осмишљеног упитника.

- Коришћење лекова (назив лека, доза и временски период коришћења лека)- Подаци ће бити добијени помоћу посебно осмишљеног упитника.
- Информације о студирању: година уписа на студије, тренутна година студија, просечна оцена остварена током досадашњег студирања, обнављање студијских година ( која студијска година и колико пута). Подаци ће бити добијени помоћу посебно осмишљеног упитника.

## Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је помоћу програма G power, при чему су постављени почетни параметри: снага студије 80%, вероватноћа грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе, средња вредност концентрације витамина Д 21.1 nmol/l са стандардном девијацијом (СД) од  $\pm 14$  nmol/l. Уз такве параметре, добијена је потребна величина узорка од 90 испитаника.

## Фармакокинетичка и статистичка обрада података

Анализа прикупљених података биће вршена употребом софтверског програма НОНМЕМ-а (верзија 5, ниво 1.1, дупла прецизност). Основни статистички критеријум који овај програм користи јесте минимална објективне функције (МОФ) која се дефинише као негативни двоструки логаритам вероватноће података.

Процене фармакокинетичких параметара у испитиваној популацији ће се употребом наведеног софтвера најпре добити за тзв. базни модел односно процена средње, популационе вредности поменутих фармакокинетичких параметара (без испитивања утицаја појединих фактора) као и величина њихове интер- и интраиндивидуалне варијабилности. Затим следи процес униваријатне селекције где се појединачно испитује утицај сваког фактора (телесне масе, висине, старости пацијената, пола, укупне дневне дозе испитиваног витамина) уз придржавање статистичких критеријума за ову анализу (за појединачно испитивање сваког фактора потребна је статистички значајна разлика МОФ-а од 3.841 ( $\chi^2=3.841$ ,  $P<0.05$ ,  $df=1$ )). Потом се само они фактори који су задовољили статистичку значајност истовремено убацују градећи на тај начин пун модел. За добијање коначног модела врши се процес уназадне делеције сваког фактора из пуног модела. Тада је неопходно испунити строжије статистичке критеријуме ( разлика МОФ-а већа од 6.6 ( $\chi^2=6.6$ ,  $P<0.01$ ,  $df=1$ ) како би се добили фактори коначног модела.

За процену предиктивних перформанси и валидности фармакокинетичких модела испитиваног витамина користи се валидациони сет. Може се рећи да је то интерни стандард саме анализе на којем ће се показати да ли је добијени модел добар, предвидљив и примењив за клиничку употребу. Такође ће бити израчунате предективне грешке (средња предиктивна грешка, квадратна предиктивна грешка, корен средње квадратне предиктивне грешке) које служе за процену биаса и прецизности добијених модела.

У статистичкој обради података, континуалне варијабле ће бити презентоване као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD) у тексту и табелама, а категоријске као пропорција испитаника са одређеним исходом. За поређење средњих вредности континуалних варијабли користиће се Студентов  $t$ -тест за мале независне узорке, односно



алтернативним непараметријским тестом уколико резултати не прате нормалну расподелу, што ће бити утврђено помоћу Колмогоров-Смирнов теста. За утврђивање постојања корелације измерених концентрација витамина Д са постигнутим успехом учења, нивоом депресије, анксиозности, мишљењем и памћењем код испитаника вршиће се методом линеарне регресионе анализе и утврђивањем коефицијента корелације употребом Excel-а из Microsoft Office програмског пакета и програма SPSS верзија 18. Статистичка значајност у примењеним тестовима биће одређена вредношћу  $p < 0.05$  као и 95% интервали поверења.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

Од добијених резултата у овој студији се очекује добијање средњих популационих вредности фармакокинетских параметара (клиренса и волумена дистрибуције) 25-хидроксивитамина Д као и откривање и квантификација свих фактора који у значајној мери утичу на клиренс, интра- и интериндивидуалну варијабилност наведеног витамина код здраве, младе популације, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Такође, резултати студије треба да укажу на постојање/непостојање корелације измерене серумске концентрације наведеног витамина са са постигнутим успехом учења, проценом меморије, мишљења, депресије и анксиозности код студената. Добијени резултати би допринели индивидуализацији дозног режима витамина Д у популацији младих, здравих особа.

## **2.9. Оквирни садржај дисертације**

Истраживање је замишљено као проспективна студија типа серије случајева, која ће одредити средње популационе вредности клиренса и волумена дистрибуције 25-хидрокси витамина Д у студентској популацији. Студија би требало да идентификује и квантифицира фактора који у значајној мери утичу на наведене фармакокинетичке параметре витамина Д. Очекује се да би добијени резултати допринели рационалнијем дозирању витамина Д.

## **2.10. Предлог ментора**

За ментора се предлаже **доц. др Јасмина Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

## **2.11. Научна област дисертације**

Медицина и фармација. Уже области Клиничка и експериментална фармакологија.

## 2.12 Научна област чланова комисије

1. Проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација, председник
2. Доц. др Јасмина Миловановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија са токсикологијом, члан
3. Доц. др Радмила Величковић- Радовановић, доцент Медицинског факултета, одсек фармације, Универзитета у Нишу, за ужу научну област Клиничка фармакологија, члан

## Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова, дипл. фарм. Оливера Миловановић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза дипл. фарм. Оливере Миловановић бити од научног и практичног значаја, јер развојем популационог фармакокинетичког модела витамина ствара се могућност за индивидуални дозни режим витамина Д код људи.
4. Комисија предлаже Наставно- научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **дипл. фарм. Оливере Миловановић** под називом „**Популациона фармакокинетика 25-хидрокси витамина Д код студената**“ и одобри њену израду.

Чланови комисије:

**1. Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација, председник

---

**2. Доц. др Јасмина Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија са токсикологијом, члан

---

**3. Доц. др Радмила Величковић- Радовановић**, доцент Медицинског факултета, одсек фармације, Универзитета у Нишу, за ужу научну област Клиничка фармакологија, члан

---

У Крагујевцу, 04.12.2012. године