

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU- FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta na sednici održanoj 21.06.2018. godine, donelo je odluku (broj 1499/2) kojom je imenovana Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Faktori rizika za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća povezani sa oksidativnim stresom u populaciji Srbije**”, kandidatkinje magistra farmacije Živke Malić, asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta „Bijeljina”.

Komisija u sastavu:

1. Prof. Dr Aleksandra Topić - redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor i predsednik komisije
2. Dr Đorđe Francuski - viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, mentor
3. Prof. Dr Zorica Lazić - redovni profesor, Univerzitet u Kragujevcu - Fakultet medicinskih nauka
4. Dr Dragica Radojković - naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija magistra farmacije Živke Malić, pod nazivom „**Faktori rizika za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća povezani sa oksidativnim stresom u populaciji Srbije**” napisana je na 136 strana, sadrži 32 tabele, 24 slike i 194 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Cilj istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Na početku disertacije je priložen

Rezime na srpskom i na engleskom jeziku, dok se na kraju nalazi Biografija kandidata, Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjava o korišćenju.

U **Uvodu** su predstavljeni patofiziološki mehanizmi, povezani sa oksidativnim stresom u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP). Takođe, u okviru ovog poglavlja predstavljeni su poznati sredinski i genetski faktori rizika, koji su povezani sa oksidativnim stresom, kao i njihove interakcije, za nastanak i razvoj HOBP.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje genetskih i ne-genetskih faktora rizika povezanih sa oksidativnim stresom, kao i njihovih interakcija, u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) u populaciji Srbije. Dodatno, cilj je bio da se ispita i potencijalni značaj biomarkera koji su povezani sa oksidativnim stresom u dijagnostici i predikciji težine HOBP-a.

U poglavlju **Materijal i metode** predstavljeni su podaci o ispitanicima i metodama koje su korišćene za analizu predloženih biomarkera. U istraživanju je učestvovalo 195 pacijenata obolelih od HOBP (89 žena i 106 muškaraca) i 326 zdrava ispitanika (134 žene i 192 muškarca). Istraživanje je izvedeno kao case-control studija, sprovedeno u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na osnovu prethodne saglasnosti svih medicinskih ustanova koje su učestvovala u studiji.

Kontrolna grupa je obuhvatila zdrave ispitanike kod kojih je isključeno prisustvo HOBP i drugih akutnih i hroničnih bolesti na osnovu anamnestičkih podataka, normalnih vrednosti laboratorijskih rezultata, fizičkog pregleda i auskultacije pluća. Kod pacijenata, hronična opstruktivna bolest pluća je dijagnostikovana i klasifikovana prema težini na osnovu istorije bolesti, fizičkog pregleda i spirometrijskih parametara: forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđene vrednosti, FEV1), forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti, FVC) i indeks FEV1/FVC. Za procenu stepena oksidativnog stresa mereni su sledeći parametri: ukupni oksidativni status (TOS), ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) i 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG). Pušački status je procenjen kvalitativno (pušači, nepušači, bivši pušači) i kvantitativno. Kvantitativna procena pušačkog statusa procenjena je na osnovu kumulativnog efekta pušenja izraženog kao paklo/godine i pomoću biomarkera izloženosti nikotinu, njegovog metabolita, kotinina.

Osnovne karakteristike ispitanika (starost, antropometrijski parametri i pušački status) su prikupljene putem upitnika. Koncentracije osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara su

određene primenom rutinskih laboratorijskih metoda na hemijskim i hematološkim analizatorima (Instrumentation Laboratory® ILab 650, Beckman Synchron CX9 Pro, and Coulter®HmX). Parametri za procenu oksidativnog stresa, ukupni oksidativni status (TOS) i ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) su određeni u serumu, kolorimetrijski (metoda je aplikovana na automatskom analizatoru AU 400, Beckman Coulter, Inc, Brea, USA). Nivo oksidativnog stresa je procenjen na osnovu oksidativnog indeksa (OSI) koji je izraženu arbitralnim jedinicama (AU): $OSI (AU) = TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv/L}) / TAS (\text{mmol trolox equiv/L})$. Nivo biomarkera sistemskog oksidativnog stresa, 8-oxodG je određen je u urinu, primenom kombinovanih tehnika visokoosetljive tečne hromatografije pod visokim pritiskom i masene spektrometrije (HPLC-MS/MS), a nivo ovog biomarkera je normalizovan na nivo urinarnog kreatinina i izražen kao indeks 8-oxodG/kreatinin. Koncentracije urinarnog kreatinina određene su primenom HPLC metode, nakon tečno-tečne ekstrakcije dihlormetanom u alkalnoj sredini, dok je kumulativno dejstvo duvanskog dima izraženo kao indeks paklo/godine na osnovu podataka prikupljenih od ispitanika [paklo/godina = godine pušačkog staža x (broj popušenih cigareta dnevno/20)]. Genotipizacija je vršena u uzorku genomske DNK, koja je izolovana iz pune krvi primenom GeneJET™ DNA purification Kit (Thermo Scientific) ili CTAB (cetil trimetil amonijum bromid) metode. Prinos i kvalitet izolovane DNK proveravan je elektroforetski na agaroznom gelu. Za detekciju genskih varijanti CYP1A *1A/2A*, GSTP1 Ile105Val, mEPH Tyr113His, mEPH His139Arg, korišćena je PCR-RFLP metoda, dok je detekcija genskih varijanti GSTT1 *nulti i GSTM1 *nulti vršena pomoću multipleks PCR metode.

U poglavlju **Rezultati** prikazane su osnovne kvalitativne i kvantitativne karakteristike svih ispitanika, pacijenata obolelih od HOBP i kontrolne grupe. Ispitane su razlike u koncentracijama biohemijskih, hematoloških i parametara za procenu oksidativnog stresa u serumu i urinu zdravih ispitanika i HOBP-pacijenata, kao i uticaj pola, godina starosti, indeksa telesne mase (BMI) i pušačkog statusa na ove razlike. Analizirani su udruženi uticaji pola, stepena izloženosti duvanskom dimu i oksidativnog stresa na nastanak i razvoj HOBP. Primenom odgovarajuće statističke metode (parametarska Pearson-ova ili neparametarska Spearman-ova korelaciona analiza) ispitane su korelacije između parametara oksidativnog stresa, kreatinina, indeksa telesne mase (BMI) i godina starosti u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP. Dodatno, kod HOBP-pacijenata ispitane su korelacije između parametara plućne funkcije i parametara oksidativnog stresa. Binarnom logističkom regresijom identifikovani su genetski i ne-genetski prediktori za nastanak HOBP kod svih ispitanika, kao i u populacijama muškaraca i žena. Primenom ROC krive ispitana je dijagnostička tačnost

parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i izloženosti duvanskom dimu. Analizirane su genske varijante enzima povezanih sa oksidativnim stresom (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX) i utvrđena je distribucije alela, genotipova i kombinacija genotipova u obe grupe ispitanika. Takođe, ispitana je povezanost između genskih varijanti ispitivanih enzima i osetljivosti prema pojavi i razvoju HOBP. U okviru analize udruženih uticaja genetskih i ne-genetskih faktora rizika, ispitana je udružen uticaj pola, pušačkog statusa, oksidativnog stresa i genskih varijanti ispitivanih enzima na nastanak i razvoj HOBP-a.

Diskusija je napisana jasno i pregledno. U diskusiji su predstavljena naučno zasnovana objašnjenja dobijenih rezultata ove doktorske disertacije. Prikazani su podaci drugih istraživanja, publikovani u relevantnim naučnim časopisima i dat je uporedni pregled sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Na kraju disertacije, prikazani su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura**, navedene su 194 reference, Vankuverskim stilom.

B. OPIS DOBIJENIH REZULTATA

Rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije su prikazani jasno i veoma detaljno, odgovarajućim redosledom. Najvažniji rezultati ove doktorske teze će biti izloženi opisno.

Pacijenti oboleli od hronične opstruktivne bolesti pluća su imali značajno više nivoje serumskih i urinarnih biomarkera oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu grupu (u serumu ukupni oksidativni status-TOS i oksidativni indeks-OSI, u urinu, 8-oxodG/kreatinin). Takođe, kod HOBP-pacijenata primećen je viši nivo cirkulišućih leukocita, a snižen nivo hemoglobina i eritrocita u odnosu na zdrave ispitanike. Nivoi ukupnog anti-oksidativnog statusa (TAC) i urinarnog kotinina se nisu razlikovali između HOBP-pacijenata i kontrolne grupe. Očekivano, kod pušača su primećeni značajno viši nivoi urinarnog kotinina u odnosu na nepušače u obe grupe ispitanika. Analiza uticaja pola na povezanost pušenja sa nivoom urinarnog kotinina pokazala je da je nivo urinarnog kotinina značajno povišen kod žena-pušača u odnosu na žene nepušače, u obe grupe ispitanika (zdrave žene i pacijentkinje sa HOBP). Muškarci su imali značajno viši nivo serumskog biomarkera TAC u odnosu na žene u grupi pacijenata-pušača i u grupi pacijenata sa teškom i veoma teškom bolešću. Značajno više vrednosti urinarnog biomarkera sistemskog oksidativnog stresa 8-oxodG/kreatinina su dobijene kod HOBP-

pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike u grupama pušača i bivših pušača. U grupi HOBP-pacijenata, uočena je povezanost između indeksa telesne mase (BMI) i nivoa izlučenog 8-oxodG/kreatinina. Neuhranjeni pacijenti ($BMI < 18 \text{ kg/m}^2$) su imali više vrednosti biomarkera 8-oxodG/kreatinina u odnosu na pacijente sa normalnom telesnom masom ($BMI 18-25 \text{ kg/m}^2$). Kod zdravih ispitanika, starijih od 50 godina, uočen je značajno viši nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina u odnosu na osobe mlađe od 50 godina, dok u grupi pacijenata nije uočen uticaj starenja na nivo izlučenog biomarkera 8-oxodG/kreatinin. Analizom udruženog uticaja pušenja i oksidativnog stresa na težinu bolesti, utvrđen je značajno viši nivo urinarnog biomarkera 8-oxodG/kreatinin kod pacijenata sa teškim oblikom HOBP, koji su pri tome i teški pušači (paklo/godina >30), u odnosu na one sa umereno teškom bolešću i istom težinom pušenja. Takođe, značajno viši nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina primećen je kod pacijenata sa teškim oblikom HOBP koji su pri tome i teški pušači (paklo/godina >30), u odnosu na umerene pušače (paklo/godina <30), sa istom težinom bolesti.

Korelacionom analizom, kod HOBP-pacijenata, dobijena je pozitivna korelacija između parametara anti-oksidativne zaštite (TAC) i spirometrijskih markera plućne funkcije (FEV1/FVC), kao i negativna korelacija između parametara oksidativnog statusa (TOS i OSI) i parametara funkcije pluća.

Analiza dijagnostičke tačnosti parametara oksidativnog stresa, primenom ROC krive, pokazala je njihov odličan potencijal u razdvajanju pacijenta sa HOBP od zdravih ispitanika. Za parametre TOS i OSI dobijena je izvanredna dijagnostička tačnost (površine ispod krivih: za TOS=0,914 i za OSI=0,925) i za 8-oxodG/kreatinin je dobijena odlična dijagnostička tačnost (površina ispod krive=0,855). Utvrđene su granične vrednosti (cut-off) za parametre oksidativnog stresa: za TOS 0,055 mmol H_2O_2 Equiv./L (osetljivost 0,710 i specifičnost 0,942); za OSI 0,0175 (osetljivost 0,774; specifičnost 0,895) i za 8-oxodG/kreatinin 1,69 nmol/mmol (osetljivost 0,732; specifičnost 0,868).

Analiza povezanosti pojedinačnih genskih varijanti ispitivanih enzima, CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, mEPH S i F i rizika za nastanak HOBP nije pokazala njihovu veću učestalost kod pacijenata sa HOBP u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, utvrđeno je da prisustvo genske varijante GSTM1 *nulte predstavlja rizik za nastanak HOBP za pušače (OR, 95% CI: 2,27, 1,00-5,19; $p < 0,05$). Analiza složenih genotipova je pokazala da prisustvo složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom (GSTM *nulti ili GSTT1 *nulti) predstavlja značajan faktor rizika za razvoj HOBP kod žena ($p=0,008$; OR, 95% CI: 3,22, 1,32-7,82). Ovaj rizik je dvostruko veći kod žena aktivnih pušača ($p=0,001$; OR, 95% CI: 7,61, 2,11-

27,44). Ispitivanjem udruženog uticaja genetskih i ne-genetskih faktora rizika, pokazano je da je najveće smanjenje plućne funkcije kod HOBP-pacijenata povezano sa udruženim uticajem više faktora kao što su: povišen oksidativni stres (8-oxodG/kreatinin>3,5 nmol/mmol), teški oblik pušenja (paklo/godine>30) i prisustvo mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću. Utvrđena je i povezanost oksidativnog stresa, određenih genskih varijanti ispitivanih enzima i pojave HOBP. Tako je u grupi nepušača, nastanak HOBP bio povezan sa visokim vrednostima za 8-oxodG/kreatinin i to kod osoba sa jednim od genetskih faktora rizika: GSTP1 105Val alel ili mEPH niske enzimske aktivnosti ili prisustvom složenog genotipa GSTM1 *plus/GSTT1 *plus/mEPH niske enzimske aktivnosti.

Binarnom logističkom regresijom utvrđeno je da povišen oksidativni stres (procenjen kao OSI ili 8-oxodG/kreatinin), starenje, inflamacija (povišeni leukociti), kumulativno dejstvo duvanskog dima (paklo/godine), snižena vrednost indeksa telesne mase (BMI) i prisustvo složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP. U odnosu na pol, pokazano je da starenje ostaje nezavisan prediktor kod muškaraca (OR, 95% CI: 1,29, 1,12-1,48; p<0,001), dok je kod žena pojava HOBP povezana sa povišenim intenzitetom pušenja (OR, 95% CI: 1,09, 1,01-1,16; p=0,02) i prisustvom složenog genotipa GSTM1/GSTT1 sa najmanje jednom delecijom (OR, 95% CI: 23,67, 2,62-213,46; p<0,001).

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

U ovoj doktorskoj disertaciji, rezultati su na jasan i kompetentan način upoređeni i diskutovani sa relevantnim i aktuelnim literaturnim podacima. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su, po prvi put, ukazali na interakciju genetskih varijanti enzima koji su uključeni u razvoj oksidativnog stresa i sredinskih faktora na nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća u populaciji Srbije. Značaj ove doktorske disertacije se ogleda i utvrđenim dijagnostičkim karakteristikama biomarkera oksidativnog stresa.

Brojne studije su pokazale da oksidativni stres ima ključnu ulogu u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća (1-5). Kod pacijenata sa HOBP utvrđen je porast nivoa pro-oksidanasa, dok istovremeno fiziološka anti-oksidativna zaštita opada, što stvara uslove za razvoj oksidativnog stresa (6). U prilog tome govore i rezultati ove disertacije, koji su pokazali da je kod pacijenata prisutan viši nivo oksidativnog stresa (procenjen na osnovu serumskih biomarkera

TOS i OSI i urinarnog biomarkera 8-oxodG/kreatinin) u odnosu na zdrave ispitanike. Nivo ukupnog anti-oksidativnog kapaciteta (TAC) se nije razlikovao između kontrole i pacijenata, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (7,8). Ovakvi rezultati ukazuju na činjenicu da kod HOBP-pacijenata, iako očuvan, antioksidativni sistem zaštite nije dovoljan da neutrališe prekomernu produkciju toksičnih pro-oksidanasa.

Pušenje predstavlja najznačajniji sredinski faktor rizika za nastanak HOBP (9). U ovoj doktorskoj disertaciji je dobijena korelacija između nivoa urinarnog kotinina i stepena izloženosti duvanskom dimu, što je u skladu sa literaturnim podacima koji su pokazali značajno viši nivo urinarnog kotinina kod pušača u odnosu na nepušače (10,11). Viši nivo urinarnog kotinina kod pušača u odnosu na nepušače, dobijen u ovoj studiji, potvrđuje značaj kotinina kao biomarkera za procenu izloženosti duvanskom dimu. U obe grupe ispitanika, i zdravih i obolelih od HOBP, primećen je viši nivo urinarnog kotinina kod žena-pušača u odnosu na žene-nepušače, dok kod muškaraca nije bilo razlike u izlučivanju kotinina u odnosu na pušački status. Navedeni rezultati ukazuju da verovatno postoje razlike u efikasnosti primene kotinina kao kvantitativnog biomarkera za procenu izloženosti duvanskom dimu u odnosu na pol. U ovoj doktorskoj disertaciji utvrđeno je da su pacijentkinje pušači imale značajno viši nivo urinarnog kotinina u odnosu na pacijente, što se može objasniti bržim metabolizmom nikotina kod žena u odnosu na muškarce (10). Povećana osetljivost žena na dejstvo duvanskog dima pripisuje se estrogenu, koji ubrzava metabolizam pro-oksidativnih supstanci iz duvanskog dima, čime se povećava stvaranje toksičnih metabolita, što posledično utiče na razvoj oksidativnog stresa, usled iscrpljene antioksidativne zaštite (12). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da u grupama pacijenata sa HOBP koji su pušači ili koji imaju teži oblik bolesti, muškarci imaju viši nivo antioksidativne zaštite u odnosu na žene, što potvrđuje da su žene posebno izložene riziku od pojave i progresije HOBP, usled neadekvatne antioksidativne zaštite. Ovaj rezultat može biti klinički značajan u prevenciji oboljevanja od HOBP kod žena.

Brojne studije su pokazale da pušenje utiče na značajno povećanje stope oksidativnog oštećenja DNK. Povećan broj DNK oštećenja i mesta reparacije kod HOBP-pušača u odnosu na nepušače ukazuje da kod HOBP-pacijenata postoji neravnoteža između oštećenja DNK i reparacije DNK (13). U ovoj doktorskoj disertaciji je dobijen značajno povišen nivo urinarnog biomarkera 8-oxodG/kreatinina kod pacijenata koji su bili pušači i bivši pušači, što potvrđuje značajnu ulogu pušenja na razvoj oksidativnog stresa koji je povezan sa nastankom HOBP. Doprinos ove doktorske disertacije je u otkrivanju visokih vrednosti urinarnog biomarkera

8-oxodG/kreatinin kod bivših pušača, što ukazuju na štetnost kumulativnog efekta pušenja na nastanak DNK lezija i nakon prestanka pušenja.

Analiza povezanosti oksidativnog stresa i višegodišnjeg pušačkog staža pokazala je da pacijenti sa teškim oblikom HOBP, a koji su pri tome i teški pušači, imaju značajno viši nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina u odnosu na pacijente sa umerenim oblikom HOBP i istom težinom pušenja. Dodatno, kod pacijenata sa teškim oblikom HOBP, viši nivo 8-oxodG/kreatinina je uočen u grupi teških pušača u odnosu na umerene pušače. Navedeni rezultati ukazuju na značajnu ulogu oksidativnog stresa koji je uzrokovan teškim pušenjem u progresiji hronične opstruktivne bolesti pluća.

Negativna korelacija između parametara oksidativnog stresa i spirometrijskih parametara funkcije pluća, kao i pozitivna korelacija između parametara funkcije pluća i nivoa antioksidativne zaštite, koji su dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su u saglasnosti sa literaturnim podacima (14-18). Literaturni podaci pokazuju da se kod HOBP-pacijenata sa veoma teškim oblikom bolesti dobijaju značajno povišeni nivoi za TOS, tako da se ovaj biomarker predlaže kao potencijalno dobar biomarker za procenu težine HOBP (19). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji i literaturni podaci ukazuju da povišeni oksidativni stres, nastao usled neravnoteže oksidanasa i antioksidanasa, predstavlja rizik ne samo za nastanak, nego i za pogoršanje bolesti.

Analiza dijagnostičke tačnosti u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazala da parametri oksidativnog stresa (TOS, OSI i 8-oxodG/kreatinin) imaju odličan potencijal razdvajanja pacijenata sa HOBP od zdravih ispitanika. Za navedene parametre oksidativnog stresa dobijene su granične vrednosti, sa osetljivošću preko 70% i specifičnošću preko 80%. Većina literaturnih podataka se odnose na procenu dijagnostičkog značaja parametara inflamacije u otkrivanju i praćenju HOBP (20-22), dok rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji, po prvi put ukazuju na potencijalnu primenu parametara oksidativnog stresa u dijagnostici HOBP.

Nešto starije i novije studije su pokazale da kod zdravih osoba postoji negativna korelacija između indeksa telesne mase i stepena izlučivanja 8-oxodG/kreatinina, što ukazuje da je ubrzan metabolizam kod mršavih osoba povezan sa povišenim sistemskim efektima oksidativnog stresa (23,24). Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na povezanost indeksa telesne mase i nivoa oksidativnog stresa samo kod HOBP-pacijenata. Najviše vrednosti za urinarni 8-oxodG/kreatinin izmerene su kod pothranjenih pacijenata ($BMI < 18 \text{ kg/m}^2$), što ukazuje da ovi pacijenti imaju smanjen nivo fizioloških antioksidanasa, verovatno usled nedostatka prekursora za njihovu sintezu.

U ovoj doktorskoj disertaciji uočen je značajan uticaj starenja na nivo izlučenog biomarkera 8-oxodG/kreatinin. Zdravi ispitanici, stariji od 50 godina, su imali značajno viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na ispitanike mlađe od 50 godina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije u kojima je potvrđena pozitivna korelacija između stepena oksidativnog oštećenja DNK i godina starosti u japanskoj populaciji (25).

Poznato je da HOBP predstavlja inflamatorno oboljenje i u različitim studijama je uočen značajan porast inflamatornih biomarkera kod HOBP-pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (26,27). Duvanski dim i druge štetne supstance iz spoljašnje sredine utiču na povišen nivo oksidativnog stresa kod HOBP-pacijenata, što posledično dovodi do regrutovanja inflamatornih ćelija u pluća i njihove stimulacije na produkciju slobodnih radikala i medijatora inflamacije, pri čemu se stvara začarani krug između oksidativnog stresa i inflamacije kod obolelih od HOBP (28). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da je kod HOBP-pacijenata prisutna značajna leukocitoza u odnosu na kontrolnu grupu, što je u skladu sa literaturnim podacima (29). Anemija predstavlja jedan od najznačajnijih komorbiditeta kod pacijenata sa HOBP (30-32). Visok stepen inflamacije i starenje su glavni uzroci nastanka anemije kod HOBP-pacijenata (31-34). U skladu sa literaturnim podacima, u ovoj doktorskoj disertaciji je dobijen sniženi nivo hemoglobina, koji je bio u korelaciji sa smanjenim broja eritrocita, što predstavlja karakterističan znak anemije kod HOBP-pacijenata.

Pored faktora rizika poreklom iz spoljašnje sredine, značajnu ulogu u nastanku i razvoju HOBP imaju i genetski faktori (35). Utvrđena je različita osetljivost prema nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća, uslovljena genskim varijantama enzima koji su uključeni u detoksikaciju produkata duvanskog dima (36-41). U ovoj studiji nije uočena povezanost pojedinačnih genskih varijanti enzima CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, mEPH i mEPHF sa nastankom HOBP. Iako nije uočena povezanost između varijante GSTM1 enzima i nastanka HOBP u populaciji Srbije, pokazano je da prisustvo GSTM1 *nultog genotipa, kod pušača, predstavlja rizik za nastanak HOBP. Navedeni rezultati ukazuju na značajnu ulogu aktivnog GSTM1 enzima u detoksikaciji štetnih supstanci iz duvanskog dima i sprečavanju nastanka oksidativnog stresa.

Literaturni podaci pokazuju povezanost složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa nastankom HOBP (42,43). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da postoji polna razlika u osetljivosti prema HOBP koja je povezana sa prisustvom složenog genotipa GSTM1/GSTT1. U populaciji Srbije, prisustvo složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom gena predstavlja faktor rizika za nastanak HOBP kod žena, s tim što se ovaj rizik značajno

povećava kod žena koje su aktivni pušači. S obzirom da estrogen utiče na povećanje oksidativnog stresa izazvanog izlaganjem duvanskom dimu (12), moguće je objasniti povezanost složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom u nastanku HOBP kod žena.

U ovoj doktorskoj disertaciji su otkriveni genetski faktori rizika za nastanak HOBP u grupi nepušača. Nepušači oboleli od HOBP su imali povišen nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina u prisustvu jednog od naslednih faktora rizika: prisustvo GSTP1 105Val alela, genske varijante enzima mEPH sa niskom enzimskom aktivnošću ili složenog genotipa GSTM1 *plus/GSTT1 *plus/mEPH niske enzimске aktivnosti. Novija studija (44) je takođe pokazala povezanost između GSTP Val105Val genotipa i povišenog nivoa oksidativnog stresa kod HOBP-pacijenata. Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, može se zaključiti da prisustvo alela GSTP Val105 i mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću utiču na značajno povećanje oksidativnog stresa kod HOBP-pacijenata, što posledično može dovesti do razvoja težeg oblika bolesti.

Značaj ove doktorske disertacije je otkriće podgrupe pacijenata-teških pušača kod kojih je razvijen težak oblik HOBP. Ovi pacijenti su bili nosioci genske varijante enzima mEPH sa niskom enzimskom aktivnošću i imali su povišen nivo oksidativnog stresa. Pacijenti sa istom genskom varijantom, ali koji su imali samo jedan faktor rizika, ili povišen oksidativni stres ili teške pušačke navike imali su bolje spirometrijske rezultate. Pretpostavka je da prisustvo genske varijante enzima mEPH sa niskom enzimskom aktivnošću i izloženost drugim pro-oksidansima, pored duvanskog dima, uz verovatno neadekvantou antioksidativnu zaštitu dovodi do značajnog pogoršanja HOBP.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da povišen oksidativni stres, starenje, inflamacija, kumulativno dejstvo duvanskog dima (paklo/godine), snižen BMI i prisustvo složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP. Kod muškaraca, starenje ostaje nezavisni prediktor za nastanak HOBP, dok je kod žena rizik povezan sa povećanim intenzitetom pušenja i prisustvom složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom. Značajan uticaj starenja na nastanak HOBP kod muškaraca može se objasniti time da su kod muškaraca značajno skraćene telomere u odnosu na žene (45), što ukazuje da je biološko starenje muškaraca naprednije nego kod žena, za istu starosnu dob.

Literatura

1. Neofytou E, Tzortzaki EG, Chatziantoniou A, Saifakas NM. DNA damage due to oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Int J Mol Sci.* 2012; 13(12): 16853–16864.
2. MacNee. Oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Monograph.* 2006; 1: 100–129.
3. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009; 14(1): 27–38.
4. Tavilani H, Nadi E, Karimi J, Taghi M, Goodarzi MT. Oxidative stress in COPD patients, smokers, and non-smokers. *Respir Care.* 2012; 57(12): 2090–2094.
5. Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, Battaile JT, Liu L, Patterson GA, Adair-Kirk TL, Holtzman MJ, Pierce RA. Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema. *Chest.* 2009; 135(4): 965–974.
6. Sharma A, Singh J, Kajal NC, Malhotra B, Chandey M, Kamboj SS, Kaur M. Effect of smoking status, disease severity, exacerbations on Oxidative stress and hs-CRP levels in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Human Biology Review.* 2016; 5(3): 309–320.
7. Ekin S, Arisoy A, Gunbatar H, Sertogullarindan B, Sunnetcioglu A, Sezen H, Asker S, Yildiz H. The relationships among the levels of oxidative and antioxidative parameters, FEV1 and prolidase activity in COPD. *Redox Rep.* 2017; 22(2): 74–77.
8. Yang KY, Su VY. Serum oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *J Chin Med Assoc.* 2015; 78(12): 687–688.
9. Lin JL, Thomas PS. Current Perspectives of Oxidative Stress and its Measurement in Chronic Obsructive Pulmonary Disease. *COPD.* 2010; 7(4): 291–306.
10. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; (192): 29-60.
11. Jung S, Lee IS, Kim SB, Moon CS, Jung JY, Kang YA, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kim EY. Urine cotinine for assessing tobacco smoke exposure in Korean: Analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2012; 73(4): 210–218.
12. Sin DD, Cohen SB, Day A, Coxson H, Pare' PD. Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 4(8): 671–674.
13. Caramori G, Adcock IM, Casolari P, Ito K, Jazrawi E, Tsaprouni L, Villetti G, Civelli M, Carnini C, Chung KF, Barnes PJ, Papi A. Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax.* 2011; 66(6): 521–527.
14. Mohamed NA, El-Deek SEM, Makhlof HA, Ahmed Y, El-Metwaly T. Role of hypoxia inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and total antioxidant capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Med J Cairo Univ.* 2015; 83(1): 435–441.
15. Emin S, Yordanova K, Dimov D, Ilieva V, Koychev A, Prakova G, Vlaykova T. Total antioxidant capacity of plasma determined as ferrous reducing ability of plasma in patients with COPD. *Trakia J Sci.* 2010; 8(2): 250–213.

16. Salama RHM, Elkholy MM, Sadek SH, Mahdy IG. Total antioxidant capacity as a marker in predicting severity of chronic obstructive pulmonary diseases. *Egypt J Bronchol*. 2017; 11(4): 322–326.
17. Singh S, Verma SK, Kumar S, Ahmad MK, Nischal A, Singh SK, Dixit RK. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in chronic obstructive pulmonary disease. *Scand J Immunol*. 2017; 85(2): 130–137.
18. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Altered oxidant–antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013; 17(8): 1104–1109.
19. Can U, Yerlikaya FH, Yosunkaya S. Role of oxidative stress and serum lipid levels in stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Chin Med Assoc*. 2015; 78(12): 702–708.
20. Valvi D, Mannino DM, Müllerova H, Tal–Singer R. Fibrinogen, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and outcomes in two United States cohorts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012; 7: 173–182.
21. Müller B, Tamm M. Biomarkers in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: among the blind, the one–eyed is king. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174(8): 848–849.
22. Lee SJ, Lee HR, Lee TW, Ju S, Lim S, Go SI, You JW, Cho YJ, Lee GW, Jeong YY, Kim HC, Lee JD. Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a prospective observational study. *Korean J Intern Med*. 2016; 31(5): 891–898.
23. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8–hydroxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*. 1992; 13(12): 2241–2247.
24. Mizoue T, Tokunaga S, Kasai H, Kawai K, Sato M, Kubo T. Body mass index and oxidative DNA damage: a longitudinal study. *Cancer Sci*. 2007; 98(8): 1254–1258.
25. Sakano N, Wang DH, Takahashi N, Wang B, Sauriasari R, Kanbara S, Sato Y, Takigawa T, Takaki J, Ogino K. Oxidative stress biomarkers and lifestyles in Japanese healthy people. *J Clin Biochem Nutr*. 2009; 44(2): 185–195.
26. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta–analysis. *Thorax*. 2004; 59(7): 574–580.
27. Koo HK, Kang HK, Song P, Park HK, Lee SS, Jung H. Systemic white blood cell count as a biomarker associated with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2017; 80(3): 304–310.
28. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2014; 35(1): 71–86.
29. Su B, Liu T, Fan H, Chen F, Ding H, Wu Z, Wang H, Hou S. Inflammatory markers and the risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta–analysis. *PloS One*. 2016; 11(4): e0150586.
30. Similowski T, Agusti A, MacNee W, Schönhofer B. The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD. *Eur Respir J*. 2006; 27(2): 390–396.

31. John M, Hoernig S, Doehner W, Okonko DD, Witt C, Anker SD. Anemia and inflammation in COPD. *Chest*. 2005; 127(3): 825–829.
32. Sarkar M, Rajta PN, Khatana J. Anemia in chronic obstructive pulmonary disease: Prevalence, pathogenesis, and potential impact. *Lung India*. 2015; 32(2): 142–151.
33. Robalo Nunes A, Tátá M. The impact of anemia and iron deficiency in chronic obstructive pulmonary disease: A clinical overview. *Rev Port Pneumol*. 2017; 23(3): 146–155.
34. Park JH, Sheen S, Lee JS, Oh YM, Lee JH, Yoo KH, Yoon H, Lee SD. Anemia in COPD patients of Korean obstructive lung disease (KOLD) cohort. *Eur Respir J*. 2015; 46 (suppl 59) PA2308.
35. Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax*. 2006; 61(11): 935–939.
36. Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol*. 2005; 57(1): 189–204.
37. Park JY, Chen L, Wadhwa N, Tockman MS. Polymorphisms for microsomal epoxide hydrolase and genetic susceptibility to COPD. *Int J Mol Med*. 2005; 15(3): 443–448.
38. Židzik J, Slabá E, Joppa P, Kluchová Z, Dorková Z, Skyba P, Habalová V, Šalagovič J, Tkáčová R. Glutathione S-transferase and microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Slovak population. *Croat Med J*. 2008; 49(2): 182–191.
39. Penyige A, Poliska S, Csanky E, Scholtz B, Dezso B, Schmelczer I, Kilty I, Takacs L, Nagy L. Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 152.
40. Li H, Fu WP, Hong ZH. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease: A comprehensive meta-analysis. *Oncol Lett*. 2013; 5(3): 1022–1030.
41. Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J*. 2004; 23(6): 818–824.
42. Faramawy MM, Mohammed TO, Hossaini AM, Kashem RA, Abu Rahma RM. Genetic polymorphism of GSTT1 and GSTM1 and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Crit Care*. 2009; 24(3): 7–10.
43. Dey T, Gogoi K, Unni BG, Kalita M, Bharadwaz M, Bhattacharjee M, Boruah PK, Bora T, Ozah D, Kalita M. Role of glutathione S transferase polymorphism in COPD with special reference to peoples living in the vicinity of the open cast coal mine of Assam. *PLoS One*. 2014; 9(5): e96739.
44. Gandhi G, Kaur G. Oxidative DNA damage, oxidative stress and genetic susceptibility–prognostic scores in ‘missing’ COPD cases. *Int J Hum Genet*. 2015; 15(3): 97–119.
45. Vasankari T, Jousilahti P, Knekt P, Marniemi J, Heistaro S, Lppo K, Heliovaara M. Serum cotinine predicts bronchial obstruction regardless of self–reported smoking history. *Scand J Public Health*. 2011; 39(5): 547–552.

D. OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije objavljeni su u dva časopisa sa SCI liste, kategorije M22 i u jednom časopisu kategorije M23. Jedan od časopisa je usko specijalizovan za hroničnu opstruktivnu bolest pluća, što ukazuje na aktuelnost dobijenih rezultata ove doktorske disertacije.

1. **Malic Z**, Topic A, Francuski Dj, Stankovic M, Nagorni-Obradovic Lj, Markovic B, Radojkovic D. Oxidative Stress and genetic variants of xenobiotic-metabolising enzymes associated with COPD development and severity in Serbian adults. COPD. 2017;14(1):95-104. (M22, impakt faktor: 2.160).

2. Topic A, **Malic Z**, Francuski Dj, Stankovic M, Markovic B, Soskic B, Tomic B, Ilic S, Dobrivojevic S, Drca S, Radojkovic D. Gender-related differences in susceptibility to oxidative stress in healthy middle-aged Serbian adults. Biomarkers. 2016; 21(2): 186- 193. (M22, impakt faktor: 2.016).

3. Topic A, Nagorni-Obradovic L, Francuski D, Ljujic M, **Malic Z**, Radojkovic D. Oxidative stress and polymorphism of xenobiotic-metabolizing enzymes in two patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. Biochemical Genetics 2016;54(5):746-752. (M23, impakt faktor: 1.927).

E. ZAKLJUČAK I OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija magistra farmacije Živke Malić predstavlja značajan doprinos rasvetljavanju uticaja naslednih i sredinskih faktora na pojavu i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća u populaciji Srbije. Aktuelnost istraživanja je potvrđena činjenicom da je hronična opstruktivna bolest pluća multifaktorska bolest koja predstavlja jedan od vodećih uzroka mortaliteta u svetu. Pored brojnih istraživanja, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi nastanka i razvoja HOBP nisu još uvek dovoljno razjašnjeni. Poznato je da oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi HOBP, ali se u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici i praćenju ove bolesti još uvek ne koriste biomarkeri koji su povezani sa oksidativnim stresom. Rana identifikacija faktora rizika za pojavu bolesti, pre ispoljavanja kliničkih simptoma predstavlja savremeni pristup laboratorijske dijagnostike i sastavni je deo preventivne medicine. U okviru

ove studije identifikovani su genetski i ne-genetski faktori rizika koji su povezani sa oksidativnim stresom kao i značaj njihovih interakcija za nastanak i razvoj HOBP. Značajan deo ove studije se odnosi na evaluaciju biomarkera oksidativnog stresa, koji se mogu primeniti u kliničkoj praksi u proceni rizika od pogoršanja bolesti. Takođe je značajna optimizacija i analitička evaluacija visoko osetljive metode za određivanje sistemskog biomarkera oksidativnog stresa 8-oxodG, koja je prvi put primenjena za određivanje ovog biomarkera u Srbiji.

U ovom istraživanju je utvrđeno da povišen oksidativni stres ima važnu ulogu u nastanku i progresiji HOBP, kao i da pušenje značajno utiče na povišen nivo oksidativnog stresa. Takođe, uočeno je da su žene posebno izložene riziku od pojave i progresije HOBP, usled neadekvatne antioksidativne zaštite, što bi imalo potencijalni klinički značaj u prevenciji HOBP kod žena.

Analiza genetskih faktora rizika, u ovoj studiji, je pokazala da kombinacije genskih varijanti enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX, utiču na pojavu i razvoj HOBP. Pored identifikacije ovih rizičnih genskih varijanti, utvrđena je i njihova interakcija sa sredinskim faktorima rizika. Ovaj deo studije je veoma aktuelan, jer epidemiološke studije ukazuju na individualne razlike u osetljivosti na oštećenja izazvana duvanskim dimom i aerozagađenjem, što ukazuje na značaj interakcija genetskih i sredinskih faktora rizika u nastanku HOBP i ispoljavanju bolesti.

Značajan doprinos ove studije je u identifikaciji nezavisnih prediktora koji dovode do nastanka i razvoja HOBP, kao i polne razlike prediktivnih faktora rizika. Identifikovani su nezavisni prediktori za nastanak HOBP u populaciji Srbije: povišen oksidativni stres, starenje, inflamacija, kumulativno dejstvo duvanskog dima, snižen BMI i prisustvo složenog genotipa GSTM1/GSTT1 sa najmanje jednom delecijom gena. Kod muškaraca, starenje ostaje nezavisni prediktor, dok je kod žena pojava HOBP povezana sa težinom pušenja i prisustvom složenog GSTM1/GSTT1 genotipa sa najmanje jednom delecijom gena.

Rezultati ove studije koji su se odnosili na evaluaciju dijagnostičkih karakteristika biomarkera oksidativnog stresa (TOS, OSI i 8-oxodG/kreatinin) su pokazali potencijalni značaj njihove primene u dijagnostici i prognozi HOBP.

U ovoj studiji je po prvi put otkrivena podgrupa teških pušača sa niskom mEPH fenotipskom aktivnošću i povišenim oksidativnim stresom, koji mogu razviti veoma težak oblik HOBP. Rezultati ove studije mogu biti od kliničkog značaja u prevenciji teškog oblika HOBP, koja bi se sprovodila ranim skriningom genetskih faktora rizika, preveniranjem izloženosti pro-oksidansima i preventivnom antioksidativnom terapijom.

Na osnovu prikazanih rezultata, zaključuje se da bi rano otkrivanje i identifikacija faktora rizika imalo veliki značaj u prevenciji nastanka i razvoja HOBP u populaciji Srbije.

F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Rezultati ove doktorske disertacije imaju značaj u prevenciji nastanka i razvoja hronične opstruktivne bolesti pluća.

Komisija u navedenom sastavu predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom: „**Faktori rizika za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća povezani sa oksidativnim stresom u populaciji Srbije**”, kandidata magistra farmacije Živke Malić.

Članovi Komisije:

Prof. Dr Aleksandra Topić, redovni profesor (mentor)

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Đorđe Francuski, viši naučni saradnik (mentor)

Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Prof. Dr Zorica Lazić, redovni profesor

Univerzitet u Kragujevcu - Fakultet medicinskih nauka

Dr Dragica Radojković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

U Beogradu, 06.07.2018. god.