

**NAUČNO-NASTAVNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-LjM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj luteinizirajućeg hormona na sekreciju steroida kore nadbubrega kod osoba sa slučajno otkrivenim tumorima nadbubrega“**

kandidata Asist. dr Ljiljane Marina, zaposlene u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije. Mentor je Prof. Svetlana Vujović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Akademik prof. dr Dragan Micić
2. VNS dr Miomira Ivović, Klinika za endokrinologiju, KCS
3. Prof. dr Milan Petronijević, profesor Medicinskog fakulteta VMA

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 pod nazivom „**Uticaj luteinizirajućeg hormona na sekreciju steroida kore nadbubrega kod osoba sa slučajno otkrivenim tumorima nadbubrega**“ sadrži osam poglavlja: uvod, cilj istraživanja, metodologija istraživanja, rezultati, diskusija, zaključak, literatura i spisak skraćenica. Rad je napisan na 91. strani i sadrži 4 slike, 17 tabela i 24 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu. Struktura i kompozicija rada u celini sadrži sve elemente i ispunjava sve kriterijume doktorske disertacije.

**Uvod** predstavlja prvo poglavlje i napisan je na 26 strana. U ovom delu je opisan istorijat, anatomija i savremena saznanja o embriogenezi, fiziologiji nadbubrežnih žlezda i patogenezi tumora nadbubrega. Data je definicija incidentaloma nadbubrega i prikazana

prevalencija, epidemiologija i njihove karakteristike. Predstavljena su ključna pitanja u okviru dijagnostike incidentaloma nadbubrega. Optimalne dijagnostičke i terapijske strategije koje proizlaze iz ovoga, iako esencijalne, ni do danas nisu u potpunosti jasno definisane i ostaju, i dalje, kontraverzne po nekim pitanjima. Prikazani su najnoviji stavovi i dostignuća u CT, MR i PET vizuelizaciji i tumačenja istih, a u sklopu diferencijalne dijagnostike incidentaloma. U okviru terapije i praćenja dat je najnoviji konsenzus ENSAT grupe sa preporukama za praćenje i lečenje pacijenata sa incidentalomima nadbubrega. Prikazana je veza između jajnika i nadbubrega od embriološkog razvoja, steroidogeneze i regulacije. Dat je osvrt na dosadašnja saznanja o adrenalnoj tumorigenezi i posebno ulozi insulina i LH i aktivaciji njihovih receptora u kori nadbubrega. Dalje, prikazana su dosadašnja saznanja o ulozi LH/HCG receptora u nastanku Kušingovog sindroma.

**Cilj rada** je precizno definisan - od prvog opisa slučajno otkrivenih tumora nadbubrega raste interesovanje za odgovor na temu šta dovodi do njihovog nastanka kao i do pojačane sekrecije hormona. Posebnu pažnju endokrinologa zaokuplja entitet suptilne sekrecije kortizola, tzv. subklinički hiperkorticizam ili subklinički Kušingov sindrom ili moguća autonomna sekrecija kortizola. Takođe, ostaje otvoreno pitanje zašto se adrenalni incidentalomi češće javljaju kod žena nego kod muškaraca. Imajući sve ovo u vidu, ispitivanje je imalo za cilj ispitati da li lutenizirajući hormon (LH) stimuliše sekreciju steroida u tumorima nadbubrega.

U poglavlju **Metodologija istraživanja** koje je napisano na 5 strana su opisani kriterijumi za uključivanje, kao i protokol ispitivanja ispitanica sa incidentalomima nadbubrega koji su hospitalizovani u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije. Istraživanje je obuhvatilo 492 konsektivna pacijenta sa adrenalnim incidentalomima (AI) koji su primljeni na Odeljenje za gojaznost, reproduktivne i metaboličke poremećaje. Na osnovu kriterijuma za uključivanje izabrano je 75 žena sa AI u menopauzi. Osim pacijenata sa AI istraživanje je obuhvatilo i 30 volontera koji su učestvovali kao zdrava kontrola. Svim pacijentima je pred prijem u Kliniku učinjen ultrazvučni pregled (UZ) abdomena, kao i CT/MR pregled adrenalne regije. **U okviru biohemijskih analiza** kod svih pacijenata su uzeti uzorci krvi za određivanje osnovnih biohemijskih analiza. Pored toga, uzeti su uzorci krvi za određivanje tumorskih markera: karcinoembrionskog antigena (CEA) i alfa 1 fetoproteina (AFP). **U okviru endokrinoloških analiza** pre započetog testiranja kod svih pacijenata uzeti su uzorci za određivanje baznog hormonskog statusa: kortizol, ACTH, LH, FSH, estradiol, testosteron, DHEAS, SHBG i insulin.

Nakon 48h-ovnog boravka u hospitalnim uslovima, radi određivanja dnevnog profila sekrecije kortizola uzeta je krv za jutarnji Kortizol (u 8h) i ponoćni kortizol (24h). Tokom tri dana, prema standardnoj proceduri, sakupljeni su uzorci 24h-ovnog urina za određivanje kateholamina (adrenalina, dopamina i noradrenalina). U sklopu **endokrinološkog testiranja**, a prema utvrđenom protokolu izvedeni su sledeći testovi: test opterećenja glukozom (OGTT), posturalni odgovor PRA i aldosterona, 1mg prekonocni deksametazonski supresioni test (1mg DST). Za procenu insulinske senzitivnosti korišćena je HOMA-IR.

Podaci su analizirani metodama deskriptivne i analitičke statistike. Od metoda deskriptivne statistike korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana), mere varijabiliteta (standardna devijacija i interkvartilni opseg), apsolutni i relativni brojevi. Normalnost raspodele je testirana grafičkim i matematičkim metodama. Za poređenje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa korišćen je t test (ili Mann Whitney test) za numeričke podatke i  $\chi^2$  test (ili Fisherov test) za nominalne podatke. Za procenu značajnosti povezanosti korišćen je Pearson-ov koeficijent linearne korelacije (r) za varijable sa normalnom raspodelom i Spearman-ov koeficijent korelacije ranga ( $\rho$ ) za varijable bez normalne raspodele. Za utvrđivanje značajnih prediktora kontinuiranih varijabli korišćene su najpre univarijantna a potom multivarijantna linearna regresiona analiza. Statistička značajnost je prihvaćena na nivou 0.05. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Za obradu podataka korišćen je softverski paket SPSS 21.0.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**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 140 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Istraživanje je obuhvatilo 75 bolesnica sa slučajno otkrivenim tumorima nadbubrega, prosečne starosti 60 godina i prosečnog indeksa telesne mase (ITM)  $27.60\text{kg/m}^2$  i prosečnog trajanja menopauze  $10.86 \pm 7.79$  godina. Kontrolnu grupu činila je 31 žena koje su bile uparene sa ispitanicama prema starosti, ITM i trajanju menopauze.

Na osnovu vrednosti kortizola nakon 1mg DSTa ispitanice sa AI su podeljene u dve podgrupe: 27 bolesnica sa 1mg DST kortizolom  $<50\text{nmol/L}$  – nefunkcijski adrenalni

incidentalomi (NAI) i 48 bolesnica sa 1mg DST kortizolom  $>50\text{nmol/L}$  – (moguća) autonomna sekrecija kortizola ((M)ASK).

U grupi ispitanica sa mogućom autonomnom sekrecijom kortizola 45 (93.8%) je imalo najmanje još jedan poremećaj u hipotalamus-hipofiza-nadbubreg osovini: nizak ili suprimovan ACTH, ispod  $15\text{ ng/L}$  i/ili povišen ponoćni kortizol, iznad  $149\text{ nmol/L}$ .

Najveći broj ispitanica u NAI podgrupi imao je veličinu tumora između 10 i 30mm, dok je najveći broj ispitanica sa (M)ASK imao veličinu tumora preko 30mm. Incidentalomi su bili statistički značajno većih dimenzija u grupi pacijentkinja sa (M)ASK u poređenju sa NAI. Nivo ACTH, jutarnji kortizol, kao i kortizol u 08.00h su bili slični između podgrupa, nije bilo statistički značajne razlike. Ponoćni kortizol i 1mg DST kortizol su bili statistički značajno viši kod bolesnica sa (M)ASK u odnosu na bolesnice sa NAI. Vrednosti LH i testosterona su bile slične između grupa, nije bilo statistički značajne razlike.

Bolesnice sa adrenalnim incidentalomima, nefunkcijskim i onim sa (mogućom) autonomnom sekrecijom kortizola ((M)ASK) bile su insulin rezistentnije u odnosu na zdravu kontrolu iste starosti i indeksa telesne mase. Bolesnice sa bilateralnim AI imale su veću prevalenciju (M)ASK u odnosu na bolesnice sa unilateralnim uvećanjima. Dalje, rezultati su pokazali da su bolesnice sa (M)ASK imale značajno nižu vrednost DHEAS u odnosu na bolesnice sa NAI.

Ispitivanje odnosa LH i HOMA-IR pokazalo je da su bolesnice sa (M)ASK imale značajnu povezanost nivoa LH sa HOMA-IR, dok kod bolesnica sa NAI nije postojala značajna povezanost nivoa LH sa HOMA-IR. Dalje, kod bolesnica sa (M)ASK postojala je značajna povezanost nivoa LH sa 1mg DST kortizolom.

Veličina tumora je bila u direktnoj povezanosti sa HOMA-IR kod bolesnica sa (mogućom) autonomnom sekrecijom kortizola dok veličina tumora nije bila u direktnoj povezanosti sa HOMA-IR kod bolesnica sa NAI.

Rezultati su pokazali da LH nije uticao na sekreciju aldosterona kod bolesnica sa slučajno otkrivenim tumorima nadbubrega kao ni na sekreciju DHEAS.

LH i veličina tumora su bili značajni prediktori HOMA-IR kod menopauzalnih bolesnica sa (M)ASK.

Bolesnice sa slučajno otkrivenim tumorima nadbubrega imale su povećanu sekreciju kortizola nakon pregnilskog testa, a bolesnice sa (M)ASK su imale jaču sekreciju kortizola nakon pregnilskog testa u odnosu na bolesnice sa nefunkcijskim uvećanjima. Odgovor kortizola na pregnilski test bio je prisutan kako kod ispitanica sa unilateralnim tako i sa bilateralnim uvećanjima.

### C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dosadašnje studije su jasno potvrdile prisustvo LH receptora u kori nadbubrega kao i u tumorima nadbubrega. Osim njihovog prisustva potvrđeno je da ovi receptori mogu biti aktivni u uslovima hronično povišenih nivoa LH. Prema dostupnoj literaturi do sada se ni jedna studija nije bavila ispitivanjem povezanosti nivoa LH sa parametrima hipotalamus-hipofiza nadbubreg osovine kod menopauzalnih žena sa adrenalnim incidentalomima.

Incidentalomi su bili statistički značajno većih dimenzija u grupi bolesnica sa (M)ASK nego u grupi sa NAI. Vassilatou i saradnici su takodje pokazali da je veličina tumora pozitivno povezana sa subkliničkim hiperkorticizmom (Vassilatou *et al.*, 2014). Ispitanice sa bilateralnim uvećanjima imale su značajno veću prevalenciju bolesnica sa (M)ASK što se takodje slaže sa dosadašnjim studijama. Paschou i saradnici su pokazali da pacijenti sa bilateralnim uvećanjima imaju veću prevalenciju subkliničkog hiperkorticizma u odnosu na pacijente sa unilateralnim adrenalnim incidentalomima (Paschou *et al.*, 2016).

Ispitanice sa (M)ASK su imale značajno nižu vrednost DHEAS u odnosu na ispitanice sa NAI. Dobro je poznata činjenica da je DHEAS hormon koji linearno opada sa godinama. Takodje, nivo DHEAS je niži kod žena u menopauzi u odnosu na žene u reproduktivnom periodu ne samo zbog razlike u godinama već i zbog toga što jedan deo DHEAS sekretuje i jajnik. U menopauzi ta sekrecija izostaje. S obzirom na to da su ispitanice sa (M)ASK bile iste starosti kao i reproduktivnog statusa kao i ispitanice sa NAI, starenje i menopauza su isključeni kao faktori koji doprinose ovakvom rezultatu. Nekoliko studija do sada je utvrdilo da je DHEAS niži kod pacijenata sa subkliničkim hiperkorticizmom (Yener *et al.*, 2015) a neki od autora su ustanovili i granične vrednosti za DHEAS koji se mogu uzimati kao dijagnostički kriterijum za postojanje (moguće) autonomne sekrecije kortizola (Dennedy *et al.*, 2016).

Povećana ekspresija receptora za insulin i IGF1 je zabeležena u adrenalnim adenomima (Kamio *et al.*, 1991). Takodje, iz kliničkog ugla, pokazano je da bolesnici sa nefunkcijskim adrenalnim incidentalomima imaju značajno više vrednosti HOMA-IR u odnosu na zdravu kontrolu uparenu prema starosti i ITM (Ivović *et al.*, 2013). Ono što je posebno važno jeste i da studije ne beleže razliku u nivou HOMA-IR izmedju NAI i bolesnika sa subkliničkim hiperkorticizmom (Ivović *et al.*, 2013) čemu idu u prilog i rezultati ovog istraživanja. Osim toga, u ovoj studiji nije bilo korelacije izmedju HOMA-IR i kortizola nakon 1mg DSTa što je u skladu sa nalazima prethodnih studija (Ivović *et al.*, 2013). Yilmaz i

saradnici su pokazali direktnu vezu između veličine tumora i 1mg DST kortizola kod nefunkcijskih adrenalnih incidentaloma. U ovoj studiji to nije bilo slučaj ali je bilo direktne povezanosti između veličine tumora i sekrecije kortizola kod bolesnica sa mogućom autonomnom sekrecijom kortizola (Yılmaz, Tütüncü and Şahin, 2009).

Ova studija je prva koja je ispitala povezanost između hronično povišenih nivoa LH i HOMA-IR kod menopauzalnih žena sa adrenalnim incidentalomima. Odnos između LH i HOMA-IR kod zdravih žena u menopauzi do sada nije bio predmet velikog broja ispitivanja. Kod žena sa PCOS Pagan i saradnici nisu našli korelaciju između LH i HOMA-IR (Pagán *et al.*, 2006) što je bio slučaj i u kontrolnoj grupi ove studije. Sa druge strane, Shoupe i saradnici su kod žena sa PCOS našli korelaciju između LH i bazalnih nivoa insulin i sugerisali da je hiperinsulinemija u vezi sa povišenim nivoima LH i androgena (Shoupe, Kumar and Lobo, 1983).

Rezultati ove studije pokazuju da su i LH i veličina tumora značajni prediktori HOMA-IR kod menopauzalnih žena sa adrenalnim incidentalomom i (mogućom) autonomnom sekrecijom kortizola, što sugerise da je interakcija između LH i insulina ta koja je ključni faktor u adrenalnoj tumorigenezi. Ovakav nalaz bi mogao da objasni zašto je među bolesnicima sa adrenalnim incidentalomima veći broj žena u odnosu na muškarce (Mantero *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 2001).

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

Marina LV, Ivović M, Tančić-Gajić M, Arizanović Z, Raković D, Milin-Lazović J *et al.* *Luteinizing hormone and insulin resistance in menopausal patients with adrenal incidentalomas: The cause-effect relationship?* Clin Endocrinol (Oxf). 2018 Apr; 88(4): 541-548 (M22, IF 3.327)

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija pod nazivom „Uticaj luteinizirajućeg hormona na sekreciju steroida kore nadbubrega kod osoba sa slučajno otkrivenim tumorima nadbubrega“ dr Ljiljane Marina kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju nastanka i steroidogeneze tumora nadbubrega. U smislu terapijskog pristupa, rezultati ovog istraživanja otvaraju pitanje da li bolesnicama sa suptilnom sekrecijom kortizola treba prepisati insulinski senzitizer kao i pitanje uvođenje estroprogestagena sa

ulaskom u menopauzu. Na osnovu navedenog, ovo istraživanje je ukazalo na klinički značaj sinergizma LH i insulinske rezistencije kao mogućeg okidača nastanka adrenalnih tumora, njihovog porasta kao i sekrecije kortizola na šta treba imati u vidu kada se razmišlja o terapijskom pristupu lečenja i praćenja adrenalnih incidentaloma.

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 Asist dr Ljiljane Marina i da odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 18.06.2018.

Članovi Komisije:

Akademik prof. dr Dragan Micić

---

VNS dr Miomira Ivović

---

Prof dr Milan Petronijević

---

Mentor:

Prof. dr Svetlana Vujović

---