

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 30.06.2023. godine, broj 14/XV-3/3-BO, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Biomarkeri inflamacije i ekstracelularne vezikule kao prediktori venske tromboembolije kod pacijenata sa limfomom“

kandidata dr Vladimira Otaševića, zaposlenog u Klinici za hematologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Mentor je Doc. dr Darko Antić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Biljana Mihaljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu – predsednik Komisije
2. Prof. dr Jelena Bila, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Predrag Đurđević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Vladimira Otaševića napisana je na ukupno 66 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, materijali i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 20 tabela, 6 grafikona i 4 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, izjavu o autorstvu, izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i izjavu o korišćenju.

U **uvodu** je naglašena heterogenost limfoma kao klonalne grupe neoplazmi. Adekvatno je obrazloženo da venska tromboembolija (VTE) predstavlja značajnu komplikaciju kod pacijenata sa limfomom. Takođe, navedeni su dosadašnji podaci vezani za učestalost VTE kod pacijenata sa limfomom, kao i modeli za procenu rizika za razvoj VTE u ovoj specifičnoj

populaciji pacijenata. Navedeno je da je imunološka disregulacija specifična patofiziološka karakteristika limfoma, koja je usko povezana sa aktivacijom inflamacije. Navodi se da pored klasičnih markera inflamacije, postoje i noviji indikatori sistemske inflamacije poput odnosa neutrofila i limfocita (*neutrophil-to-lymphocyte ratio*, NLR) i odnosa trombocita i limfocita (*platelet-to-lymphocyte ratio*, PLR). U uvodu je takođe objašnjen termin i uloga ekstracelularnih vezikula (EV), a navedena je i njihova potencijalna uloga u trombozi povezanoj sa tumorom (*cancer-associated thrombosis*, CAT).

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja povezanosti biomarkera inflamacije i razvoja VTE kod pacijenata sa limfomom koji su lečeni (imuno)hemioterapijom, ispitivanja povezanosti VTE sa tipom terapijskog lečenja i odgovora na terapiju kod pacijenata sa limfomom. Sledeći cilj je bio karakterizacija profila EV kod pacijenata sa difuznim B-krupnoćelijskim limfomom (DBKL), ispitivanje povezanosti EV sa VTE kod pacijenata sa DBKL, ispitivanje testa ukupnog hemostaznog potencijala (*overall hemostasis potential*, OHP) i povezanosti sa VTE kod pacijenata sa DBKL.

U poglavlju **materijali i metode** detaljno je obrazloženo da je u prvom delu rada sprovedena retrospektivna kohortna studija pacijenata sa limfomom, dok je u drugom delu rada sprovedena prospektivna kohortna studija pacijenata sa DBKL, i to u kolaboraciji sa Univerzitetom Karolinska, Služba koagulacije i kliničke hemije, Odeljenje za molekularnu medicinu i hirurgiju, Institut Karolinska i klinička hemija, medicinska dijagnostika Karolinska. Detaljno je navedena baterija korišćenih markera inflamacije i drugih biohemijskih parametara. Takođe, definisan je algoritam za identifikaciju EV kao i panel markera koji je korišćen za određivanje profila EV. Dodatno, objašnjeno je na koji način je ispitivano formiranje i liziranje fibrinskog ugruška putem testa OHP. Na kraju poglavlja se nalaze podaci vezani za način i metode korišćenje u statističkoj obradi podataka.

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 302 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Biomarkeri inflamacije i ekstracelularne vezikule kao prediktori venske tromboembolije kod pacijenata sa limfomom”, autora dr Vladimira Otaševića, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 15%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je tzv. opštih mesta i podataka, prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz njegove disertacije, kao i korišćenja fraza i naziva koje su karakteristične za tematiku disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

U retrospektivnom delu istraživanja, od 706 pacijenata sa dijagnozom limfoma uključenih u studiju, ukupno je 69 pacijenata (9,8%) razvilo VTE. Većina pacijenata imala je simptomatsku VTE (41/69), a takođe je kod većine pacijenata došlo do razvoja VTE tokom lečenja (52,1%). Učestalost VTE bila je najveća kod pacijenata sa agresivnim NHL (non-Hoćkin limfom) (11,8%), potom kod pacijenata sa HL (Hoćkin limfom) (8,4%), a najmanja kod pacijenata sa indolentnim NHL (5,8%). U poređenju sa pacijentima bez VTE, NLR, PLR, ESR (brzina sedimentacije eritrocita), CRP (C-reaktivni protein) i LDH (laktat dehidrogenaza) su bili statistički značajno povišeni kod pacijenata sa VTE, dok su TP (ukupni proteini) i albumin bili statistički značajno niži. U univarijantnoj regresionoj analizi, NLR, PLR, TP, albumin, LDH i CRP su se pokazali prognostičkim faktorima za razvoj VTE kod pacijenata sa limfomom. B-simptomatologija, „bulky“ tumorska masa, zahvatanje medijastinuma i ECOG PS (performans status) bili su značajni kliničko-patološki prognostički faktori za razvoj VTE kod pacijenata sa limfomom. U multivarijantnom regresionom modelu, NLR i CRP su se pokazali kao nezavisni prognostički faktori za razvoj VTE kod pacijenata sa limfomom ($p=0,046$ i $p=0,024$). Analiza ROC krive (*receiver operating characteristic*) pokazala je zadovoljavajuću senzitivnost (S_n) i specifičnost (S_p) NLR, PLR i CRP u predikciji VTE kod pacijenata sa limfomom ($p=0,001$ za sva tri: NLR, PLR i CRP). Nezadovoljavajući terapijski odgovor na (imuno)hemioterapiju bio je povezan sa razvojem VTE. Kompletna remisija bila je ređa kod pacijenata sa limfomom koji su razvili VTE nego kod onih koji nisu razvili VTE. Pacijenti sa limfomom kojima su ordinirani

intenzivni hemioterapijski protokoli u prvoj liniji ili „salvage“ hemioterapijski protokoli, imali su veću stopu VTE u odnosu na pacijente sa limfomom koji su lečeni standardnim terapijama prve linije. Prospektivni deo istraživanja sproveden je na grupi od 62 pacijenta sa dijagnozom DBKL. Ukupno je 11 pacijenata (17,7%) razvilo VTE. Ukupna koncentracija Annexin V+ EV bila je statistički značajno veća kod pacijenata sa DBKL u odnosu na zdrave kontrole. Takođe, koncentracija TF+ EV bila je značajno veća u grupi pacijenata sa DBKL u odnosu na kontrolnu grupu. Nadalje, koncentracija sledećih EV bila je statistički značajno veća kod pacijenata obolelih od DBKL u odnosu na zdrave kontrole: TF+/CD42b+ (tkivni faktor; PEV - *platelet-derived extracellular vesicles*), TF+/P-selektin-, TF+/P-selektin+, TF+/E-selektin-, TF+/E-selektin+, TF+/CD19+, TF+/CD19-, CD19+/CD20+, TF+/CD45-, TF+/CD45+, TF+/CD20+, TF+/CD19+, TF+/CD19-, TF-/CD19+. Sa druge strane, koncentracija sledećih EV se nije statistički razlikovala između dve pomenute grupe: TF+/CD42b-, TF-/CD42b+, TF-/P-selektin+, TF-/E-selektin-, TF-/CD19+, TF-/CD45+, TF+/CD20-, TF-/CD20+. Nije opservirana statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih Annexin V+ EV kao i TF+ EV kod pacijenata sa DBKL i VTE u odnosu na pacijente sa DBKL bez VTE, kao ni statistički signifikantna razlika u koncentraciji drugih EV obuhvaćenih istraživanjem u odnosu na razvoj VTE. Korišćenjem Cox-ove regresione analize, ni ukupna koncentracija Annexin+ EV niti TF+ EV nisu pokazale povezanost sa ukupnim preživljavanjem (OS). U poređenju grupa pacijenata sa DBKL i VTE odnosno bez VTE, kao i u poređenju sa ishodom OS, nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji gore pomenutih EV. OHP analiza urađena je na podgrupi od 11 pacijenata sa DBKL, a kod jednog pacijenta (9,1%) došlo je do razvoja VTE. S obzirom na mali uzorak pacijenata za OHP analizu, nisu urađene statističke analize značajnosti razlike.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove disertacije po pitanju učestalosti razvoja VTE kod pacijenata sa limfomom su slični rezultatima studija koje su bile usredsređene na agresivne limfome (Dharmavaram i sar, 2020, Yokoyama i sar., 2012, Borg i sar., 2016), što je u skladu sa činjenicom da je više od polovine studijske populacije ovog rada imalo dijagnozu agresivnog limfoma. Nekoliko do sada publikovanih studija identifikovalo je prediktivnu moć NLR i PLR za razvoj VTE (Farah i sar., 2020, Ferroni i sar., 2015). Prema dosadašnjim saznanjima, izuzev rezultata iz ove disertacije, ne postoje publikovane studije koje su ispitivale NLR i PLR i rizik od razvoja VTE kod pacijenata sa limfomom. Nalaz da su pacijenti sa limfomom koji su postigli nezadovoljavajući terapijski odgovor bili podložniji razvoju VTE je u skladu sa objavljenim

podacima koji potvrđuju povezanost između agresivnog limfoma i uznapredovalog stadijuma bolesti, što rezultira kraćim OS i većom stopom mortaliteta (Leković i sar., 2010, Mahajan i sar., 2014, Byun i sar., 2019, Yokoyama i sar., 2015). Pored toga, u studiji Dharmavaram i sar. (Dharmavaram i sar., 2020) negativan uticaj VTE na preživljavanje i mortalitet pokazan je kod pacijenata sa DBKL. Nalaz veće stope razvoja VTE kod pacijenata koji su primali intenzivne hemioterapijske protokole prve terapijske linije ili „salvage“ hemioterapijske protokole u odnosu na one koji su lečeni standardnim protokolima prve linije, je u saglasnosti sa do sada publikovanim podacima (Borchmann i sar., 2019). U prospektivnom delu istraživanja kod pacijenata sa DBKL ukupna koncentracija Annexin V+ EV bila je statistički značajno veća od koncentracije Annexin V+ EV kod zdravih kontrola. Statistički signifikantno veće koncentracije TF+ EV, TF+ PEV, TF+ P-selektin EV, TF+ E-selektin EV, EV porekla DBKL/B-ćelijske populacije i TF+ EV porekla DBKL/B-ćelijske populacije su nađene u grupi pacijenata sa DBKL u odnosu na koncentracije EV pomenutih obrazaca kod zdravih kontrola. U poređenju grupa pacijenata sa DBKL i VTE odnosno bez VTE, kao i u poređenju sa ishodom ukupnog preživljavanja, nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji prethodno pomenutih EV. Koncentracija EV kod pacijenata sa malignitetom je oko 2 puta veća u odnosu na zdrave kontrole (Kalluri i sar., 2016), što je u saglasnosti sa rezultatom iz disertacije. U skladu sa gore navedenim nalazom je i nalaz povišene koncentracije CD20+ EV porekla DBKL (Rutherford i sar., 2018). Pretpostavka je da EV porekla tumora, koje eksprimiraju TF, doprinose i da su povezane sa razvojem VTE (Gardiner i sar., 2015). U korelaciji sa navedenom činjenicom su rezultati disertacije, gde je ukupna koncentracija TF+ EV bila veća kod pacijenata sa DBKL u odnosu na zdrave kontrole. Međutim, konkretna komparacija rezultata nije moguća jer nisu identifikovane studije koje su se do sada bavile ukupnim brojem EV kod pacijenata sa DBKL, a takođe do sada nije rađena karakterizacija profila navedenih EV: TF+ PEV, TF+ P-selektin EV, TF+ E-selektin EV, TF+ EV porekla DBKL/B-ćelijske populacije. Interpretacija OHP analize i nivoa D-dimera u prospektivno praćenoj grupi pacijenata sa DBKL sa odnosno bez VTE bila je značajno limitirana skromnom veličinom uzorka pacijenata, iako su u deskriptivnoj obradi podataka uočene numeričke razlike u vrednosti D-dimera. Ovaj rezultat je u skladu sa velikim brojem do sada publikovanih podataka, te se danas koristi kao nezaobilazan biomarker primarno za isključivanje trombotičkih događaja (Johnson i sar., 2019). Negativnu prognostičku snagu D-dimera za dijagnozu DVT potvrdili su *Wells* i sar. (Wells i sar., 2003), a potom se ista potvrdila za sve entitete VTE (Wells, 2007, Di Nisio i sar., 2007). U gotovo svim istraživanjima koja su se bavila incidencijom VTE kod pacijenata sa DBKL, nivo D-dimera

nije bio jedan od ciljeva istraživanja. Primarni razlog je da su istraživanja uglavnom bila retrospektivna i da analiza D-dimera nije rutinski rađena. Što se tiče rezultata OHP, sami autori su u disertaciji naveli limitaciju malim uzorkom pacijenata, što je onemogućilo sprovođenje adekvatne interpretacije statističkih testova u poređenju grupe pacijenata sa DBKL u odnosu na razvoj VTE. Postoji niz publikacija u kojima su testirane performanse ovog testa u protrombotičkim stanjima kod nekancerskih pacijenata, kako u fiziološkim tako i patološkim stanjima (Westerlund i sar., 2012, Antovic i sar., 2003, Wang i sar. 2022, Curnow i sar., 2007). Takođe, publikovani su i rezultati koji nisu identifikovali razliku u vrednostima OHP kod pacijenata sa odnosno bez VTE (Farm i sar., 2020, Lim i sar., 2019).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Otasevic, V., Mihaljevic, B., Milic, N., Stanisavljevic D., Vukovic V., Tomic K., Fared J., Antic D. **Immune activation and inflammatory biomarkers as predictors of venous thromboembolism in lymphoma patients.** *Thrombosis J* 20, 20 (2022). M21 IF: 5.509

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Biomarkeri inflamacije i ekstracelularne vezikule kao prediktori venske tromboembolije kod pacijenata sa limfomom“ dr Vladimira Otaševića predstavlja originalni naučni doprinos po pitanju povezanosti inflamacije sa razvojem VTE kod pacijenata sa limfomom. Rezultati disertacije su pokazali da lako dostupni markeri inflamacije mogu adekvatno da reflektuju nivo inflamacije i stratifikuju pacijente sa limfomom koji su u povećanom riziku za razvoj VTE. Takođe je pokazano da je nezadovoljavajući terapijski odgovor na (imuno)hemioterapiju povezan sa razvojem VTE kod pacijenata sa limfomom. Prema gore navedenim metodološkim principima, ovaj rad se među prvima bavi profilom EV kod pacijenta sa DBKL i potencijalnom ulogom EV kod ovih pacijenata. S obzirom da je koncentracija EV povećana kod pacijenata sa dijagnozom DBKL, smatramo da se ovaj podatak može koristiti kao inicijalni nalaz za dalja istraživanja na ovu temu. Iako nije uočena razlika u koncentraciji EV kod pacijenata sa limfomom po pitanju VTE, dalja istraživanja na većem broju ispitanika su neophodna radi sticanja novih saznanja, s obzirom da ovaj nalaz može biti posledica većeg broja različitih faktora. OHP analiza se čini kao zanimljiv metod za potencijalno ispitivanje prokoagulantnog stanja kod pacijenata sa limfomom, ali za definitivno ispitivanje ove pretpostavke potrebna su dalja istraživanja, takođe na većem uzorku pacijenata.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Vladimira Otaševića i odobri njegovu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 10.07.2023.

Članovi Komisije:

Prof. dr Biljana Mihaljević

Prof. dr Jelena Bila

Prof. dr Predrag Đurđević

Mentor:

Doc. dr Darko Antić
