

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

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 10.04.2014. godine, imenovani smo u Komisiju za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije koja je prijavljena pod naslovom „**Pokazatelji oksidativnog stresa i inflamacije kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća i komorbiditetom**“, kandidata dipl.farmaceuta-medicinskog biohemičara Ivane Stanojković.

Posle pregledane disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 91 stranu, ima 24 tabele, 11 slika i 115 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (14 strana), Ciljevi istraživanja (2 strane), Ispitanici i metode (8 strana), Rezultati istraživanja (37 strana), Diskusija (14 strana), Zaključci (4 strane) i Literatura.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: 1) da se ispita postojanje razlike u oksidativnostresnom statusu, inflamaciji, proteaza/antiproteaza sistemu i markerima resorpcije kostiju između pacijenata sa HOBP i zdravih ispitanika uparenih po godinama i polu; 2) da se ispita postojanje razlike u oksidativnostresnom statusu, inflamaciji i proteaza/antiproteaza sistemu kod HOBP pacijenata sa dijagnostikovanim kardiovaskularnim bolestima u odnosu na pacijente bez kardiovaskularnih bolesti; 3) da se ispita značaj parametara oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema kao potencijalno novih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod HOBP pacijenata; 4) da se ispita razlika u resorpciji koštanog tkiva između HOBP pacijenata i kontrolne grupe kao i uticaj egzacerbacije bolesti na nivo resorpcije koštanog tkiva u odnosu na stabilno stanje; 5) da se ispita uticaj respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i disbalansa proteaza/antiproteaza sistema na nivo markera resorpcije kostiju kod HOBP pacijenata.

U poglavlju **Materijali i metode** su dati podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 210 pacijenata sa dijagnozom hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP). Među pacijentima podjednako su zastupljena oba pola, a svi pacijenti su stariji od

40 godina. Dijagnoza HOBP postavljena je u skladu sa kriterijumima "Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)". Pacijenti su uključeni u studiju nakon prijema u Kliniku za pulmologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u stanju egzacerbacije. Stanje egzacerbacije kategorizovano je u skladu sa kliničkom slikom i standardima lekarske prakse. Pacijenti su zadržani na kliničkom lečenju u proseku 7 do 10 dana, kada je lekarskim pregledom konstatovano da pacijent može nastaviti dalje lečenje u kućnim uslovima. Svim učesnicima istraživanja preporučeno je dolazak na kontrolni pregled u roku od 30 dana od dana prijema, u klinički stabilnom stanju. Od 210 pacijenata primljenih u stanju egzacerbacije na kontrolni pregled javilo se 85 pacijenata.

Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije bili su dijagnostikovani rak pluća, tuberkuloza, psihička oboljenja, skorija hirurška intervencija ili trauma, upotreba hipoglikemika ili antioksidativnih suplemenata.

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima i Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Sve osobe od kojih je uziman biološki materijal koji je kasnije korišćen u istraživanju, potpisale su pristanak za dobrovoljno učešće u studiji i obaveštene su o ciljevima i očekivanim ishodima studije. Demografski podaci, podaci o pušenju, konzumiranju alkohola, fizičkoj aktivnosti, porodičnoj istoriji bolesti, lekovima koje koriste i drugim parametrima posmatranim u studiji, dobijeni su popunjavanjem upitnika od strane istraživača, putem usmenog intervjua sa ispitanicima. Na osnovu statusa pušenja pacijenti su podeljeni u tri grupe, na pušače, nepušače i bivše pušače (oni koji nisu pušili najmanje 6 meseci pre trenutka uključivanja u studiju).

Dalja podela pacijenata izvršena je na osnovu dijagnoze komorbiditeta. Podela je izvršena na osnovu prisustva ishemijske bolesti srca (IBS). Dijagnoza IBS postavljena je na osnovu preporuke European Society of Cardiology guidelines. Ishemijska bolest srca dijagnostikovana je kod 66% ispitivanih pacijenata. Od ukupnog broja u dalja ispitivanja uključeno je 35 pacijenata sa IBS, koji su ispunili uslov da nemaju druge komorbiditete. Kod ispitivanja vezanih za osteoporozu, kriterijum za isključivanje iz studije bio je već dijagnostikovana osteoporozu i/ili frakture u poslednje 2 godine.

Kontrolnu grupu čini 47 zdravih osoba, uparenih po godinama i polu sa pacijentima. Isključujući kriterijumi za ispitanike u kontrolnoj grupi bile su sve sistemske bolesti, uključujući plućne i kardiovaskularne bolesti i osteoporozu, inflamacija, infekcije ili neurološke bolesti. Dodatni kriterijumi za isključivanje iz kontrolne grupe bila je dislipidemija ili upotreba hipolipemika, frakture u poslednje 2 godine, kao i upotreba antiresorptivne i hormonske terapije. Žene uključene u kontrolnu grupu kod ispitivanja osteoporoze su postmenopauzalne, starije od 50 godina.

Prvi uzorak krvi uzet je od pacijenata nakon prijema na kliničko lečenje, u okviru 24 sata. Nakon prijema na kliničko lečenje, pacijentima je data inhalaciona bronhodilatatorna terapija u obliku beta-2 agonista i/ili ipratropijum bromid. Tretman u toku hospitalizacije uključivao je

primenu kiseonične terapije, beta-2 agoniste, ipratropijum, teofilin, antibiotike i sistemske kortikosteroide. Drugi uzorak krvi uzet je na otpustu sa kliničkog lečenja 7-10 dana nakon hospitalizacije. Treći uzorak je uzet na kontrolnom pregledu nakon mesec dana od otpusta iz bolnice kada su pacijenti bili u klinički stabilnom stanju. Svi uzorci krvi uzimani su iz prednje kubitalne vene nakon perioda noćnog gladovanja (više od 10 sati). Krv je sakupljena vakutajner sistemima sa etilendiaminotetrasircetnom kiselinom (EDTA) za izdvajanje plazme i vakutajnerima sa serum gel separatorom za dobijanje seruma. Uzorci su čuvani na +4°C do najviše 24h, a zatim centrifugirani na 1500xg, deset minuta. Plazma i serum su odvajani u alikvote i čuvani na -80°C do trenutka analiziranja.

Svim pacijentima su određeni parametri respiratorne funkcije. Spirometrija je sprovedena u skladu sa ATS/ERS standardima. Mereni su zapremina forsiranog ekspirijumskog volumena u prvoj sekundi (FEV₁) i forsirani vitalni kapacitet (FVC), a arterijske gasne analize obuhvatile su određivanje parcijalnog arterijskog pritiska kiseonika (P_{a,O_2}) i ugljendioksida (P_{a,CO_2}).

Pacijentima i ispitanicima u kontrolnoj grupi određeni su parametri inflamacije i to hsCRP i procenat neutrofila. Od parametara oksidativnog stresa određen je nivo superoksidnog anjona, malondialdehida (MDA), produkata uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) i totalni oksidativni status (TOS). Za određivanje antioksidativnog kapaciteta određivana je aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid-dismutaze (SOD) i paraoksonaze (PON1), kao i totalni antioksidativni status (TAS). Kao parametar odnosa oksidativnog i antioksidativnog statusa određivan je prooksidativni/antioksidativni balans (PAB).

Svim ispitanicima su određeni parametri lipidnog statusa, proteaza/antiproteaza sistema i marker resorpcije kostiju. Od parametara lipidnog statusa određeni su koncentracije ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola, triglicerida i apolipoproteina A-I i apolipoproteina B. Parametri proteaza/antiproteaza sistema obuhvataju matriks metaloproteinazu-9 (MMP9), tkivni inhibitor metaloroteinaze-1 (TIMP1) i kompleks MMP9-TIMP1. Kao marker resorpcije kostiju određena je koncentracija beta-izomera C-terminalnih telopeptida kolagena tipa I (beta-CL) koji je proizvod degradacije organskog koštanog tkiva.

B. OPIS DOBIJENIH REZULTATA

U istraživanju je učestvovalo 210 pacijenata sa opstruktivnom bolešću pluća i 47 zdravih osoba. Prilikom anketiranja ispitanika, uzeti su podaci o starosti, pušenju, izmerena im je visina i telesna težina. Kod pacijenata je takođe izvršena podela u skladu sa GOLD klasifikacijom po stadijumima bolesti. Starost, zastupljenost polova, telesna građa izražena kroz indeks telesne mase, kao i kategorije vezane za navike pušenja u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi ne pokazuju statistički značajne razlike. U grupi pacijenata zastupljeniji su pacijenti u poodmakloj fazi bolesti, stadijumi III i IV, u odnosu na pacijente u početnoj fazi bolesti, stadijum I i II.

Kod pacijenata su merenja parametara respiratorne funkcije, oksidativnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema izvršena na prijemu na kliničko lečenje (u stanju

egzacerbacije), na otpustu sa kliničkog lečenja i kontrolnom pregledu (u klinički stabilnom stanju). Ispitivanja su bila usmerena na dokazivanje razlike u vrednostima ovih parametara kod pacijenata u sve tri tačke posmatranja u odnosu na grupu zdravih osoba, kao i dokazivanje razlike u grupi pacijenata između tri tačke posmatranja, pre svega stanja egzacerbacije i klinički stabilnog stanja.

Od parametara respiratorne funkcije mereni su FEV_1 (u % i L), FVC (u % i L), odnos FEV_1/FVC (u %) i Pa_{O_2} (u kPa). Statističkom analizom pokazano je da svi parametri osim odnosa FEV_1/FVC , imaju značajno najnižu vrednost na prijemu.

Zbog prirode bolesti očekivano je da su pacijenti sa HOBP u stanju uznapredovalog oksidativnog stresa, kao i da nivo oksidativnog stresa zavisi od stanja u kome se nalaze, odnosno da li su u stanju egzacerbacije ili u stabilnom stanju. Koncentracije parametara oksidativnog stresa, superoksidni anjon, MDA, AOPP i TOS, statistički su značajno više kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu u sve tri tačke praćenja pacijenata. Kada se posmatraju promene koncentracija parametara oksidativnog stresa kroz faze oporavka uočava se da koncentracije svih parametara rastu u toku kliničkog lečenja, sa trendom opadanja na kontrolnom pregledu, ali se i dalje zadržava statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod parametara antioksidativne zaštite, SOD, paraoksonaze i TAS, uočen je drugačiji trend promene vrednosti kroz faze oporavka pacijenata i u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost SOD, koja je najviša na prijemu, polako opada do otpusta i kontrolnog pregleda i sve vreme je značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost paraoksonaze je kod pacijenata takođe niža u odnosu na kontrolnu grupu, ali ta razlika nije značajna. Vrednosti TAS kod pacijenata su takođe niže u odnosu na kontrolnu grupu, od prijema do otpusta se smanjuju, na kontrolnom pregledu su nešto više, ali i kod ovog parametra nema statistički značajne razlike.

Vrednosti PAB koje predstavljaju odnos snaga prooksidativnog i antioksidativnog sistema više su kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, što je posledica pojačanog oksidativnog stresa i smanjene antioksidativne zaštite u odnosu na zdrave osobe u kontrolnoj grupi. Kod pacijenata je izmerena viša vrednost PAB u odnosu na zdrave, ali ova razlika nije statistički značajna.

U sledećem delu poglavlja **Rezultati** analizirani su parametri inflamacije, jer je poznato da je jedna od osnovnih karakteristika HOBP hronična inflamacija. U cilju praćenja inflamacije u zavisnosti od stanja u kome se pacijenti nalaze određeni su koncentracija hsCRP i procenat neutrofila u leukocitarnoj formuli. Statističkom analizom pokazano je značajno povećanje oba parametara inflamacije kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti hsCRP i procenat neutrofila su statistički značajno više na prijemu u odnosu na otpust i kontrolni pregled, s tim da je koncentracija hsCRP viša na kontrolnom pregledu u odnosu na otpust, dok procenat neutrofila opada u odnosu na otpust.

Pretpostavka da kod HOBP pacijenata postoji disbalans proteaza/antiproteaza sistema ispitana je određivanjem koncentracija proteaze MMP9 i antiproteaze TIMP1, kao njihovog kompleksa. Koncentracija proteaze MMP9 statistički je značajno je veća kod pacijenata u odnosu

na kontrolnu grupu u sve tri tačke, ali bez značajne razlike između vrednosti na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu. Koncentracije MMP9 najviše su na prijemu u stanju egzacerbacije i daljom stabilizacijom stanja pacijenata koncentracije opadaju. Koncentracije TIMP1 su takođe statistički značajno više kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti na prijemu i otpustu su niže u odnosu na vrednosti na kontrolnom pregledu, ali razlika nije statistički značajna. Vrednosti kompleksa MMP9-TIMP1 kod pacijenata statistički značajno su više na prijemu i otpustu od vrednosti u kontrolnoj grupi, kao i od vrednosti na kontrolnom pregledu, koje se približavaju vrednostima u kontrolnoj grupi.

Da bi se ispitala eventualna korelacija između ispitivanih parametara kod HOBP pacijenata korišćena je metoda Spearman-ove neparametarske korelacione analize. Korelacija je izračunata za vrednosti koje su dobijene na prijemu, a takođe i za vrednosti koje su dobijene na kontrolnom pregledu. Izračunata je korelacija između parametara respiratorne funkcije i parametara oksidativno-stresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema, zatim između između parametara oksidativno-stresnog statusa i parametara inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema i na kraju između parametara inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema.

Najčešći razlog nastanke osteoporozе je disbalans između resorpcije i sinteze koštanog tkiva, na račun pojačane resorpcije. Eventualno postojanje pojačane resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata ispitano je određivanjem koncentracije beta-CL u stanju egzacerbacije i u stabilnom stanju. Koncentracije beta CL statistički je značajno je veća u odnosu na kontrolnu grupu u oba stanja i istovremeno veća na prijemu u odnosu na kontrolni pregled. Takođe je ispitano i da li postoji korelacija koncentracije beta-CL sa parametrima respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema.

U cilju ispitivanja uticaja pojedinih parametara na nivo beta-CL u stanju egzacerbacije, korišćena je multipla regresiona analiza. Formirani su modeli koji ispituju uticaj markera respiratorne funkcije, inflamacije i oksidativnostresnog statusa na nivo beta-CL. Rezultati ove analize pokazuju da su procenat neutrofila i nivo TIMP1 odgovorni za 18% varijabilnosti koncentracije beta-CL, ako se doda i uticaj hipoksije tada je 25% varijabilnosti beta-CL posledica njihovog udruženog efekta. Kao najbolji model pokazao se model u koji su, pored pomenutih parametara, uključeni još i TOS i PON1. Ovaj model pokazuje da je skoro 60% varijabilnosti u koncentraciji beta-CL posledica interakcije respiratorne disfunkcije, inflamacije i oksidativnostresnog statusa.

Jedan od ciljeva istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje veze između respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnog statusa i proteaza/antiproteaza sistema i razvoja ishemijske bolesti srca (IBS) kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća. U ovu fazu ispitivanja uključeno je 60 pacijenata u klinički stabilnom stanju, od kojih je kod 36 pacijenata dijagnostikovana IBS. Poređenjem parametara respiratorne funkcije između pacijenata sa i bez IBS, dokazano je da pacijenti sa IBS imaju redukovani respiratorni kapacitet jer postoji značajna razlika u vrednostima FEV₁ i FVC.

Postojanje pojačanog oksidativnog stresa kod populacije pacijenata sa HOBP već je prikazano u prethodnim analizama. U ovom delu istraživanja ispitano je postojanje razlike u oksidativnom statusu u zavisnosti od prisustva IBS. Vrednosti parametri oksidativnog stresa su više kod HOBP pacijenata sa IBS, ali razlika nije statistički značajna a takođe i parametri antioksidativne zaštite kod podgrupe sa IBS imaju niže vrednosti, ali i ovde razlika nije statistički značajna.

U ispitivanju razlike u vrednostima parametara inflamacije između grupa HOBP pacijenata sa i bez IBS pokazano je da pacijenti sa IBS imaju veću koncentraciju hsCRP i procenat neutrofila u odnosu na HOBP pacijente bez IBS, ali razlika i u ovom slučaju nije značajna.

Kao što je ranije navedeno, kod pacijenata sa HOBP postoji disbalans u proteaza/antiproteaza sistemu. Dalje je ispitano postojanje razlike u koncentracijama parametara proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa i bez IBS i dokazano je da pacijenti sa IBS imaju značajno više vrednosti koncentracije TIMP1 u odnosu na pacijente bez IBS. Razlika u koncentracijama MMP9 i kompleksa MMP9-TIMP1 nije statistički značajna.

Za ispitivanje uticaja tradicionalnih faktora za razvoj KVB kod HOBP pacijenata određeni su parametri lipidnog statusa. Poređenjem dobijenih vrednosti u podgrupama sa i bez IBS nije dokazana statistički značajna razlika bez obzira na više vrednosti svih ispitivanih parametara u podgrupi sa IBS.

Prethodnom analizom pokazano je da između pacijenata sa i bez IBS postoji značajna razlika samo u koncentraciji TIMP1, pa je daljom analizom ispitano da li u ove dve podgrupe postoji korelacija ovog parametra sa drugim ispitivanim parametrima. Ispitivanjem korelacije između parametara respiratorne funkcije i TIMP1, u podgrupi HOBP pacijenata sa IBS dokazana je negativna korelacija sa PaO₂, dok je u podgrupi pacijenata bez IBS postoji korelacija sa % FVC. Analizom korelacija parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa nivoom TIMP1 kod pacijenata sa i bez IBS dokazana je pozitivna korelacija sa TOS kod pacijenata sa IBS i pozitivna korelacija TIMP1 sa TAS kod pacijenata bez IBS. Kod HOBP pacijenata sa IBS postoji korelacija između TIMP1 i procenta neutrofila, a u podgrupi pacijenata bez IBS nije dokazana nikakva korelacija između TIMP1 i parametara inflamacije. Takođe, u obe podgrupe nema značajne korelacije između TIMP1 i parametara lipidnog statusa.

Cilj ove doktorske disertacije je i ispitivanje potencijalne prediktorske moći parametara respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnog statusa i proteaza/antiproteaza sistema na razvoj IBS kod pacijenata sa HOBP. U tu svrhu korišćena je logistička regresiona analiza. Logističkom regresionom analizom parametara respiratorne funkcije dokazano je da najbolju prediktorsku moć na razvoj IBS ima smanjenje FVC (u %). Posle modifikacije vrednosti FVC za pol, pušenje i godine starosti prediktorska moć se povećava. FEV₁ postaje značajan prediktor posle modifikovanja vrednosti za pol i godine. Prediktorska moć odnosa FEV₁/FVC postaje značajna nakon modifikovanja vrednosti za pušenje i godine, dok vrednosti PaO₂ nemaju prediktorski značaj ni u jednom modelu.

U logističkoj regresionoj analizi uticaja parametara oksidativnostresnog statusa na razvoj IBS, najveća prediktorska moć dokazana je za TOS. Nakon modifikovanja vrednosti parametara oksidativnostresnog statusa za pol i pušenje, nijedan parametar ne pokazuje prediktorsku moć na razvoj IBS. Međutim, modifikovanjem vrednosti ovih parametara za godine starosti, prediktorska moć se značajno povećava.

Logističkom regresionom analizom pokazano je i da hsCRP ima bolju prediktorsku moć za razvoj IBS od procenta neutrofila, ali ipak bez statističkog značaja. Modifikovanjem vrednosti parametara inflamacije za pol i pušenje njihova prediktorska moć se ne menja, dok modifikovanjem vrednosti za godine starosti, i hsCRP i procenat neutrofila postaju značajni prediktori za razvoj IBS. Logistička regresiona analiza uticaja parametara proteaza/antiproteaza sistema za razvoj IBS pokazala je da visoku prediktorsku moć ima TIMP1. Modifikovanjem ovih vrednosti za pol, pušenje i godine starosti, TIMP1 zadržava prediktorsku moć. MMP9 vrednosti modifikovane za pušenje, kao i godine starosti postaju značajan prediktor za razvoj IBS. Kompleks MMP9-TIMP1 postaje značajan prediktor samo nakon modifikovanja vrednosti za godine starosti.

Prediktorska moć parametara lipidnog statusa na razvoj IBS kod HOBP pacijenata nema statističkog značaja. Međutim, nakon modifikovanja vrednosti za godine starosti, prediktorska moć svih parametara lipidnog statusa postaje statistički značajna.

Nakon što je logističkom regresionom analizom dokazano da TIMP1 ima najbolju prediktorsku moć za procenu rizika za razvoj IBS, analiza je ponovljena dodavanjem drugih parametara, za koje je ranijim ispitivanjima ukazano da su značajni faktori rizika za razvoj IBS, kako bi se ispitao njihov uticaj na prediktorsku moć TIMP1. Istovremeno je urađena i analiza ROC krivih sa izračunavanjem površine ispod ROC krivih (AUC). Prediktivna moć TIMP1 ostaje značajna u različitim modelima, koji su formirani dodavanjem FEV₁ (u %), hsCRP i TOS, pojedinačno ili svih zajedno. Analizom ROC krivih može se uočiti da sve krive zadovoljavaju postavljene kriterijume. Iako TIMP1 ima odličan dijagnostički značaj, dodatkom drugih faktora rizika procenat tačno klasifikovanih pacijenata se povećava.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Hronična opstruktivna bolest pluća je bolest koju karakteriše hronična opstrukcija disajnih puteva, a kao posledica specifičnih strukturalnih abnormalnosti nastalih u disajnim putevima i plućnom parenhimu. Ove strukturalne promene u plućima nastaju kao posledica hronične inflamacije, praćene oksidativnim stresom i proteolizom ekstracelularnog matriksa. Kao glavni faktor rizika za razvoj ove bolesti navodi se pušenje. Pored pušenja faktori iz spoljašnje sredine, kao što su čestice aerozagađenja i radnog okruženja takođe imaju uticaja na razvoj ove bolesti. Interakcijom spoljašnjih i unutrašnjih faktora nastaju patofiziološke karakteristike HOBP. Bolest takođe karakterišu i povremena pogoršanje opšteg stanja pacijenata, stanja egzacerbacije. Učestalost egzacerbacija utiče na stadijum težine bolesti i prognozu bolesti.

Izloženost pluća oksidansima je konstantna, bilo egzogenog ili endogenog porekla. Pluća se štite od štetnog uticaja oksidanasa dobro razvijenim enzimskim i neenzimskim antioksidativnim sistemima. Kada se naruši balans između oksidanasa i antioksidativne zaštite nastaje oksidativni stres. Brojne studije ukazale su na pojačan oksidativni stres u plućima pacijenata sa HOBP u poređenju sa zdravima, ali istovremeno i sa pušačima slične istorije pušenja kod kojih sa nije razvila HOBP (1, 2). Povećani nivo oksidanasa kod pacijenata sa HOBP povećava i nivo proizvoda oksidacije, uz istovremeno opadanje nivoa antioksidativne zaštite.

Oksidativni stres u plućima oštećuje plućno tkivo utičući na nivo opstrukcije disajnih puteva. Nekoliko studija pokazalo je postojanje korelacije između markera oksidativnog stresa i nivoa opstrukcije disajnih puteva (3). Rezultati ove studije pokazali su da je visok nivo superoksidnog anjona u stanju egzacerbacije praćen smanjenjem FEV₁ i FEV₁/FVC odnosa. Negativna korelacija u stanju egzacerbacije dokazana je još i između AOPP i FEV₁/FVC odnosa, dok je u stabilnom stanju AOPP u negativnoj korelaciji sa FEV₁ i FVC. Povišeni totalni oksidativni status pacijenata u stanju egzacerbacije prati opadanje respiratorne funkcije, sa najizraženijim smanjenjem FVC.

Oksidativni stres igra i vrlo značajnu ulogu u pojačavanju inflamacije, a hronična inflamacija jedna je od osnovnih karakteristika HOBP. U ovoj studiji je pojačana inflamacija dokazana visokim koncentracijama hsCRP, a i neutrofilijom u stanju egzacerbacije koja se smanjuje u toku bolničkog lečenja i dalje stabilizacijom bolesti. Imajući u vidu da su neutrofili kod HOBP pacijenata glavni izvor superoksidnog anjona i posledično oksidativnog stresa sa jedne, i pojačane genske ekspresije brojnih medijatora inflamacije sa druge strane, može se zaključiti da je neutrofilija dodirna tačka oksidativnog stresa i inflamacije kod HOBP. Prethodne studije ukazale su na korelaciju između broja neutrofila i parametara respiratorne funkcije, kao i broja neutrofila i opstrukcije disajnih puteva (4).

Reaktivne kiseonične grupe oslobođene iz aktiviranih neutrofila reaguju sa brojnim proteazama i antiproteazama, dovodeći do disbalansa u njihovom odnosu (5). To se pre svega ispoljava inaktivacijom endogenih antiproteaza u plućima. Matriks metaloproteinaze su značajni učesnici u razgradnji tkivnog matriksa pluća, pa disbalans sa njihovim inhibitorima je značajan faktor u samoj patogenezi HOBP. Pinto-Plata i saradnici pokazali su da HOBP pacijenti imaju više koncentracije MMP9 i TIMP1 u cirkulaciji u odnosu na zdrave i da je istovremeno nivo MMP9 u jakoj korelaciji sa frekvencom egzacerbacija (6). Takođe, povećane koncentracije MMP9 prisutne i u stabilnom stanju, dovode se u vezu sa pojačanom inflamacijom kod HOBP. U ovoj studiji nivo MMP9 znatno je viši u odnosu na zdrave u svim stadijumima praćenja HOBP pacijenata. Porast koncentracije MMP9 u stanju egzacerbacije u odnosu na stabilno stanje prati neznatno smanjenje koncentracije TIMP1, verovatno kao posledica hroničnog karaktera ove bolesti.

Osteoporoza je jedna od posledica sistemskih efekata HOBP. Neki od faktora koji utiču na pojavu osteoporoze kod ovih pacijenata su ujedno i posledica same bolesti pluća, kao što je redukovana respiratorna funkcija i posledično smanjena fizička aktivnost, smanjena masa

skeletnih mišića, zatim kortikosteroidna terapija i hormonalni status, tj. hipogonadizam prirodno prisutan u starosnom dobu koje je karakteristično za ove pacijente. Cilj ove studije bio je dokazivanje postojanja hronične pojačane resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata, što bi za posledicu imalo i pojavu osteoporoze. U ovoj studiji dokazano je prisustvo povećanih koncentracija markera resorpcije koštanog tkiva beta-CL u cirkulaciji kod HOBP pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, a ovakvi rezultati u skladu su sa prethodnim studijama (7). Prethodne studije ukazale su na povezanost između opadanja respiratorne funkcije praćene hipoksijom i broja egzacerbacija sa smanjenjem gustine koštanog tkiva (8). U ovoj studiji nije dokazana korelacija između koncentracije beta-CL i nivoa parametara respiratorne funkcije, kako u stanju egzacerbacije tako i u stabilnom stanju.

Ranije je dokazano da sistemska inflamacija može biti od velikog značaja u progresiji osteoporoze kod HOBP pacijenata. Mehanizam kojim hronična inflamacija dovodi do povećanja rizika od osteoporoze još uvek nije u potpunosti razjašnjen. U prethodnim studijama dokazano je da pojačanu produkciju pro-inflamatornih citokina kao što su IL-1, TNF- α i IL-6 često prati pojačana resorpcija kostiju, a kao posledica njihovog uticaja na aktivaciju osteoklasta (9). U ovoj studiji dokazana je pozitivna korelacija između koncentracija hsCRP i beta-CL u klinički stabilnom stanju pacijenata, upućujući na zaključak da hronična inflamacija znatno utiče na resorpciju koštanog tkiva.

Oksidativni stres jedan je od mehanizama za pojačanje inflamacije kod HOBP. Naime, dokazano je da proizvodi lipidne peroksidacije deluju kao signalni molekuli koji dovode do pojačanog oslobađanja inflamatornih medijatora. Ovi inflamatorni medijatori dalje pojačavaju gensku ekspresiju drugih inflamatornih markera. Pojačanu inflamaciju uvek prati i pojačanje oksidativnog stresa (10). U ovoj studiji je u stanju egzacerbacije dokazana pozitivna korelacija između koncentracija produkta lipidne peroksidacije, MDA i markera resorpcije koštanog tkiva, beta-CL. Sa druge strane, da i smanjenje antioksidativne zaštite kod HOBP može uticati na resorpciju koštanog tkiva, dokazano je u ovoj studiji negativnom korelacijom između paraoksonaze i beta-CL.

Pojačana aktivnost matriks metaloproteinaza kod HOBP pacijenata takođe se dovodi u vezu sa pojavom osteoporoze. Matriks metaloproteinaze imaju regulatornu funkciju u prometu koštanog tkiva, dok MMP9 i direktno utiče na aktivaciju osteoklasta (11). Bolton i saradnici su dokazali da povećane koncentracije MMP9 kod HOBP pacijenata koreliraju sa prisustvom osteoporoze nezavisno od respiratorne funkcije (12). Značajan izvor MMP9 i TIMP1 kod HOBP su neutrofili (13). Ispitivanjem povezanosti visokog nivoa proteolize sa nivoom resorpcije, u ovoj studiji je kod klinički stabilnih pacijenata dokazana pozitivna korelacija između TIMP1 i beta-CL. Pozitivna korelacija između procenta neutrofila i koncentracije beta-CL može biti posmatrana kao veza između izvora oksidativnog stresa, inflamacije i proteolitičkog sistema i pojačane resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata.

Ranije studije ukazale su na činjenicu da HOBP može biti sama po sebi nezavisni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Naime, opadanje FEV₁, kako kod HOBP tako i u

opštoj populaciji, znači veći rizik od KVB. Sin i saradnici dokazali su da pacijenti u grupi sa najnižim FEV₁ imaju najveći rizik od KVB i pet puta veću verovatnoću od smrtnosti od ishemijske bolesti srca (IBS) u poređenju sa pacijentima sa najvišim vrednostima FEV₁ (8). Rezultati ove studije pokazali su da HOBP pacijenti sa dijagnostikovanom IBS imaju izraženiju opstrukciju disajnih puteva. Hronična inflamacija koja karakteriše HOBP još od ranije je označena kao faktor rizika za razvoj KVB i smrtnost u opštoj populaciji i među HOBP pacijentima (14, 15). Tako je CRP, marker sistemske inflamacije prepoznat i kao marker povećane smrtnosti u populaciji pacijenata sa HOBP (16). U ovoj studiji dokazano je prisustvo većih koncentracija hsCRP u cirkulaciji pacijenata sa IBS u odnosu na one kod kojih IBS nije dijagnostikovana, ali bez statističkog značaja, što se može objasniti činjenicom da su u ovu studiju uključeni HOBP pacijenti sa IBS, ne uzimajući u obzir i ostale KVB.

Ranije je već rečeno da su pacijenti sa HOBP izloženi i konstantnom oksidativnom stresu. Reaktivne kiseonične grupe oslobođene iz aktiviranih neutrofila iz periferne cirkulacije, pored pojačanog oksidativnog stresa istovremeno su odgovorne i za oksidaciju LDL i formiranje tzv. penastih ćelija, ključnog medijatora u nastanku ateroskleroze. U ovoj studiji dokazan je pojačan oksidativni stres i smanjena antioksidativna zaštita kod pacijenata sa IBS, a među njima najizraženija je razlika u TOS. Neutrofilna inflamacija dovodi do destabilizacije aterosklerotskih plakova (17). Povećani procenat neutrofila kod pacijenata sa IBS u ovoj studiji ukazuje i na povećani rizik od rupture aterosklerotskih plakova.

HOBP karakteriše i pojačana proteolitička aktivnost i destrukcija ECM u plućima (18). Ako se uzme u obzir da cirkulišući monociti pacijenata sa HOBP oslobađaju 2,5 puta više MMP9 u odnosu na zdrave i da je MMP9 uključen u patogenezu ateroskleroze (19, 20), kao i da je TIMP1 u korelaciji sa najznačajnijim konvencionalnim faktorima rizika za razvoj KVB (21), jedan od značajnih ciljeva ove studije bio je ispitivanje ovih parametara u populaciji pacijenata sa HOBP. Prvi rezultati pokazali su naročito izraženu razliku u koncentraciji TIMP1 između pacijenata sa i bez IBS. Zatim je izvršeno ispitivanje korelacije ovog parametra sa ostalim ispitivanim markerima. U grupi pacijenata sa IBS dokazana je pozitivna korelacija sa Pa_{a,O2}, ukazujući na pojačanu proteolitičku aktivnost sa povećanjem hipoksije. Takođe je dokazana pozitivna korelacija i sa procentom neutrofila, kao mogućeg izvora TIMP1. Istovremeno nije dokazana nikakva korelacija sa parametrima respiratorne funkcije i lipidnog statusa.

Jedan od ciljeva studije bio je i ispitivanje prediktorske moći ispitivanih parametara za pojavu IBS među HOBP pacijentima. Marker limitiranosti disajnih puteva predstavljaju nezavisne faktore rizika za pojavu koronarnih bolesti (22). Rezultati ove studije pokazali su da među parametrima respiratorne funkcije najbolju prediktorsku moć ima FVC. Među parametrima oksidativnostresnog statusa najbolju prediktorsku moć pokazuje TOS. Marker inflamacije i lipidnog statusa nemaju prediktorsku moć za pojavu IBS u grupi ispitanika sa HOBP. Kod parametara proteaza/antiproteaza sistema, kao parametar sa najvećom prediktorskom moći za razvoj IBS izdvaja se TIMP1.

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je hronična inflamatorna bolest koja zahvata gornje i donje disajne puteve, parenhim pluća i plućnu vaskulaturu. U svetu je više od 600 miliona obolelih od HOBP, sa blizu 3 miliona smrtnih slučajeva godišnje, čineći je petim uzročnikom smrtnosti u ljudskoj populaciji širom sveta (23). Promene na plućima kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća nastaju usled hronične inflamacije praćene pojačanim oksidativnim stresom i aktivnošću proteaza. HOBP karakterišu i izraženi ekstrapulmonalni – sistemski efekti, a posledica toga su prateće sistemske bolesti. Kao prateće sistemske bolesti kod pacijenata sa HOBP najčešće se javljaju kardiovaskularne bolesti, osteoporoza, kaheksija, disfunkcija skeletnih mišića i depresija (24, 25).

Kardiovaskularne bolesti su najčešći uzročnik smrtnosti pacijenata sa HOBP, sa udelom od čak 50% (26). Mogući faktori rizika za pojavu kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa HOBP su hronična inflamacija, oksidativni stres i oštećenja vezivnog tkiva krvnih sudova nastala usled pojačane aktivnosti proteaza. Aktivirani leukociti u perifernoj cirkulaciji kod pacijenata sa HOBP oslobađaju reaktivna kiseonikova jedinjenja, povećavaju ekspresiju adhezionih molekula na endotelu zidova krvnih sudova i ekstracelularnu proteolitičku aktivnost (27-29).

Osteoporoza je sistemska bolest kostiju koju karakteriše smanjena gustina koštanog tkiva. U mnogim studijama je već dokazano da je HOBP nezavisni faktor rizika za pojavu osteoporoze (30-32). Tačni uzročnici pojave osteoporoze kod HOBP nisu poznati, ali kao mogući faktori se navode hronična inflamacija, tretman kortikosteroidima i sniženi nivo insulina sličnog faktora rasta 1 (*eng.* insulin – like growth faktora 1, IGF-1) (30, 31). Smatra se da bi se delovanje inflamacije na razvoj osteoporoze kod ovih pacijenata moglo ostvarivati posredstvom interleukina 6 (IL-6), koji stimuliše formiranje osteoklasta, dok TNF α direktno stimuliše resorpciju kostiju. Sa druge strane smanjenjem nivoa IGF-1 umanjuje se njegov anabolički efekat i uticaj na proliferaciju osteoblasta odgovornih za sintezu koštanog tkiva. Ovakav disbalans između resorpcije i formiranja kostiju naročito je izražen u akutizaciji bolesti, stanju egzacerbacije (32).

Citirana relevantna literatura

1. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 2000;117:303S-317S.
2. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003;22:14–27.
3. Langen RC, Korn SH, Wouters EF. ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD. *Free Radic Biol Med* 2003;35:226-235
4. Chan-Yeung M, Abboud R, Buncio AD, Vedal S. Peripheral leucocyte count and longitudinal decline on lung function. *Thorax* 1988;43:462-466.
5. Ficher MB, Pavlisko E, Voynov AJ. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *COPD* 2011;6:413-421.

6. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007;62:595–601.
7. Kochetkova EA, Geltser BI, Semisotova EF, Volkova MV. Biochemical and immunological markers of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Klin Med* 2002;80:31-35.
8. Kiyokawa H, Muro S, Oguma T, et al. Impact of COPD exacerbation on osteoporosis assessed by chest CT scan. *COPD* 2012;9:235–42.
9. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev.* 2007;65(12 Pt 2):S147–51.
10. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:50–60.
11. Anderson TL, del Caram Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 2004;35:1107–19.
12. Bolton CE, Stone MD, Edwards PH, Duckers JM, Evans WD, Shale DJ. Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis* 2009;6:81–7.
13. Cataldo D, Munaut C, Noel A, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy* 2001;56:145–51.
14. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-1565
15. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006;60:17-22
16. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006;60:17-22.
17. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286:152–154.
18. Cataldo D, Munaut C, Noel A, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy* 2001;56:145–151.
19. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
20. Aldonite R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S. circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res* 2003;4:11.
21. Velagaleti RS, Gona P, Sundstrom J, Larson MG, Siwik D, Colluci WS, Benjamin EJ, Vasan RS. Relation of extracellular matrix remodeling to incident of cardiovascular events and mortality. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2010;30:2283-8.
22. Engstrom G, Hedblad B, Janzon L, Valind S. Respiratory decline in smokers and ex-smokers-an independent risk factor for cardiovascular disease and death. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:267-272.
23. Agusti A . Systematic effects of COPD. *Proc Am Thorac Soc*, 2007; 4:522-525
24. Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002; 121:127S-130S.
25. MacNee W. Oxidative stress and Chronic Obstructive pulmonary disease. *Eur Respir monograph* 2006; 11:100-29.

26. Camilli AE, Robinson DR, Lebowitz MD. Death certificate reporting of confirmed airways obstructive disease. *Am J Epidemiol* 1991; 133:795-800.
27. Lattimore JD, Wilcox I, Nakhla S, Lngenfeld M, Jessup W, Celermajer DS. Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages-a potentially atherogenic effect. *Atherosclerosis* 2005; 179:255-259.
28. Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, Agusti AG. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001; 56:432-437.
29. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti AG. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1664-1668.
30. Ionescu AA, Schoon E. Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22: Suppl. 46, 64-75.
31. Hutchinson AF, Thompson MA. Acute Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations Are Associated with uncoupling of Bone Resorption from Bone Formation. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 2009:A4037.
32. Biskobing DM. COPD and osteoporosis. *Chest* 2002; 121:609-620.
33. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur respir J* 2003; 21:347-360.

E. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

M21 – Rad u vrhunskom međunarodnom naučnom časopisu

1. **Stanojkovic I**, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Milenkovic B, Vujic T, Stefanovic A, Ivanisevic J. Relationship between bone resorption, oxidative stress and inflammation in severe COPD exacerbation. *Clinical Biochemistry* 2013;46:1678-82 (IF 2.450, 8/32)

M22 – Rad u vodećem međunarodnom naučnom časopisu

2. **Stanojkovic I**, Kotur-Stevuljevic J, Milenkovic B, Spasic S, Vujic T, Stefanovic A, Ilic A, Ivanisevic J. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. *Respiratory Medicine* 2011; 105: S31-7 (IF 2.585, 51/124)

M34 – Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

3. Milenkovic B, Bozic I, Kotur J, **Stanojkovic I**, Ilic A, Jankovic J, Cvok T, Mitic J. Osteoporosis in COPD patients. *Wiener Klinische Wochenschrift* 2012;124:484-485. Jahrestagung 2012 der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie, Salzburg, Austria, 14.–16 Juni 2012

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu svega što je izloženo u doktorskoj disertaciji smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos u tumačenju uloge oksidativnog stresa u razvoju sistemskih bolesti kod bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća.

Komisija smatra da je kandidat uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „**Pokazatelji oksidativnog stresa i inflamacije kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća i komorbiditetom**“ kandidata dipl.farmaceuta-medicinskog biohemičara Ivane Stanojković.

Članovi Komisije:

1. _____
Dr Slavica Spasić, (mentor), red.profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr Jelena Kotur-Stevuljević, (mentor), vanr.profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr Branislava Milenković, red.profesor
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet