

**ПРЕДМЕТ:**  
**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ**  
**ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 25.12. 2013. године, одлуком 01-13901/3-16 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом "Промене у апоптози лимфоцита, параметрима оксидативног стреса и профилилу цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде" кандидата Олгице Михаљевић, др мед. асистента за ужу научну област Патолошка физиологија, у следећем саставу:

- 1. Проф. др Александар Ђукић, председник**  
редовни професор за ужу научну област Патолошка физиологија  
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
- 2. Проф. др Нада Пејновић, члан**  
ванредни професор за ужу научну област Патолошка физиологија  
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
- 3. Проф. др Татјана Радосављевић, члан**  
редовни професор за ужу научну област Патолошка физиологија  
Медицинског факултета Универзитета у Београду
- 4. Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић, члан**  
редовни професор за ужу научну област Хумана генетика  
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
- 5. Проф. др Предраг Ђурђевић, члан**  
ванредни професор за ужу научну област Интерна медицина  
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Олгице Михаљевић, и подноси Наставно-научном већу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

- 2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области**

Докторска дисертација кандидата Олгице Михаљевић под називом "Промене у апоптози лимфоцита, параметрима оксидативног стреса и профилилу цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде" представља оригиналну студију која се бавила испитивањем целуларних и биохемијских промене у периферној крви пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде пре и седам дана након апликације радиоактивног јода  $^{131}\text{I}$ .

Карциноми штитасте жлезде су најчешћи малигни тумори ендокриног система. У терапији диферентованих карцинома штитасте жлезде примењују се велике дозе радиоактивног  $^{131}\text{I}$ , који се крвљу транспортује до штитасте жлезде и у њој концентрише. При том долази до емитовања бета и гама зрачења, тако да системска радионуклидна терапија представља добар модел за испитивање ефеката јонизујућег зрачења у *in vivo* условима. Очекиван ефекат примене великих доза  $^{131}\text{I}$  је јонизација праћена оксидативним стресом и ослобађањем појединих цитокина, као и оштећење ћелијских макромолекула уз повећање фреквенције микронуклеуса и могућу индукцију апоптозе лимфоцита периферне крви. Иако у литератури постоји велики број радова који се односе на оксидативни стрес проузрокован јонизујућим зрачењем уопште, оксидативни стрес проузрокован пролонгираним дејством јонизујућег зрачења приликом примене радионуклидне терапије недовољно је испитан.

Микронуклеуси представљају крајњи ефекат оштећења ДНК и маркер су генотоксичног дејства јонизујућег зрачења. Могу се детектовати и у лимфоцитима периферне крви здравих особа, а њихов број је повећан код особа са различитим туморима. Осим повећања фреквенције микронуклеуса, код особа са неким туморима (главе и врата, малигног меланома) показано је и повећање апоптозе лимфоцита периферне крви непосредно након њиховог издвајања. С обзиром на то да се апоптозом уклањају неке ћелије са непоправљивим генетским оштећењем, као и да агенси који индукују хромозомске аберације изазивају повећано стварање микронуклеуса и стимулишу апоптозу, уклањање оштећених ћелија процесом апоптозе може да утиче на фреквенцију детектованих микронуклеуса

Фреквенција микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви особа са диферентованим карциномима штитасте жлезде испитивана је у базалним условима, као и након апликације радиоактивног  $^{131}\text{I}$ , док апоптоза лимфоцита непосредно након издвајања из периферне крви особа са карциномом штитасте жлезде није испитивана ни у базалним условима, нити након примене радиојодне терапије.

## **2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области**

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података "Medline" и "CoBSON" помоћу следећих кључних речи: "differentiated thyroid carcinoma",

"radioiodine therapy", "micronuclei frequency", "apoptosis of lymphocytes", "oxidative stress", "cytokines" утврђено је да до сада није спроведена студија, у којој је процењиван ефекат терапије радиоактивним јодом на апоптозу лимфоцита периферне крви, микронуклеусну фреквенцију, параметре оксидативног стреса и цитокински профил испитаника, која је по форми и садржини идентична овој студији. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата ас. др Олгице Михаљевић под називом "Промене у апоптози лимфоцита, параметрима оксидативног стреса и профили цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде" представља резултат оригиналног научног рада који доприноси разумевању промена у периферној крви, посебно лимфоцитима, насталих после примене великих доза радиоактивног <sup>131</sup>I у лечењу диферентованог карцинома штитасте жлезде.

### **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

**А)** Кандидат Олгица Михаљевић, остварила је 18.5 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- 9 радова у целини публикована у научним часописима међународног значаја.

Кандидат Олгица Михаљевић је кроз разне видове укључена у наставни и научно-истраживачки рад. Од 19.12.2008. ради као сарадник у настави за ужу научну област Патолошка физиологија, а децембра 2010. године бирана је у звање асистента у настави за исту ужу научну област. Уписана у III годину Докторских академских студија школске 2010/11. године, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина - модул Ендокринологија. Континуирани научно истраживачки рад се огледа у учешћу на пројекту Министарства науке Републике Србије, "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци" (бр. III41010), и Јуниор пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу, "Апоптоза лимфоцита периферне крви и фреквенција микронуклеуса код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде који су лечени радиоактивним јодом <sup>131</sup>I" (ЈП 06/12).

### **Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

1. **Vrndić O**, Milošević-Djordjević O, Mijatović L, Jeremić M, Stošić I, Grujičić D and Živančević Simonović S. Correlation between Micronuclei Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes and Retention of <sup>131</sup>I in Thyroid Cancer Patients. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2013, 229: 115-124. **M22=5 бодова**
2. **Olgica Vrndic**, Svetlana Savin, Ljiljana Mijatovic, Aleksandar Djukić, Ilija Jeftic and Snezana Zivancevic-Simonovic. Concentration of thyroglobulin and

- thyroglobulin-specific autoantibodies in patients with differentiated thyroid cancer after treatment with radioactive Iodine 131. *Labmedicine* (2011), 42 (1) 27-31. **M23=3**
3. **Vrndić O**, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, Mijatovic L, Jeftic I and Zivancevic Simonovic S. Radioiodine therapy accelerates apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with differentiated thyroid cancer. *Neoplasma* 2013, 60 (5) 568-75. **M23=3**
  4. **Olga Vrndić**, Snežana Živančević-Simonović, Marijana Stanojević, Ljiljana Dimitrijević, Aleksandar Đukić i Nebojša Arsenijević. Korelacija koncentracija autoantitela specifičnih za tireoidnu peroksidazu određenih korišćenjem dva radioimunološka testa. *Med Pregl* 2010, 63(1-2): 104-108. **M51=2**
  5. **Olga Vrndić**, Ilija Jeftić, Irena Kostić, Marijana Stanojević, Snežana Živančević-Simonović. Hashimoto encefalopatija, *Medicinski časopis* 2010, 44 (1): 41-44; **M53=1.0**
  6. Ilija Jeftić, Irena Kostić, **Olga Vrndić**, Vojin Kovačević. Feohromocitom: genska osnova, klinička slika i savremene mogućnosti dijagnostike. *Medicinski časopis* 2010, vol 44 (1):45-50; **M53=1.0**
  7. **Olga Vrndić**, Irena Kostić, Ilija Jeftić, Marijana Stanojević, Snežana Živančević-Simonović. Patofiziološki mehanizmi procesa starenja. *Medicinski časopis* 2010, vol 44 (3):30-36; **M53=1.0**
  8. Svetlana Miletic-Drakulic, Gordana Toncev, **Olga Vrndić**, Snežana Zivancevic-Simonovic. Neurological signs and symptoms in patients with autoimmune thyroid disease. *Ser J Exp Clin Res* 2011;12(3):123-126. **M52=1.5**
  9. Živana Minić, Suzana Matejić, Miloš Todorović, **Olga Vrndić**, Milutin Petrović. Nagnječenje mozga-mehanizam nastanka i značaj. *Medicinski časopis* 2010, vol 44 (4):16-19; **M53=1.0**

#### 2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Циљеви истраживања идентични су са одобреним у пријави тезе.

Докторска дисертација Асс. др Олгице Михаљевић, написана је на 120 страница и садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Рад садржи 21 табелу и 5 графикана, илустрован је са 3 слике, док је у поглављу "Литература" цитирано 257 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

У уводном делу кандидат је веома прецизно, користећи најсавременије литературне податке, изложио досадашња сазнања о етиопатогенези диферентованих карцинома штитасте жлезде и терапијском приступу, са посебним освртом на улогу радиоактивног јода у постоперативном третману диферентованих карцинома штитасте жлезде. У даљем теоретском разматрању акценат је стављен на актуелна сазнања о оксидативном стресу и липидној пероксидацији, апоптотском облику ћелијске смрти и микронуклеусима, као могућим последицама деловања јонизујућег зрачења, као и о субпопулацијама CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, односно поларизацији према Th1 и Th2 типу имунског одговора са одговарајућим цитокинским профилем.

У другом поглављу јасно су изложени циљеви истраживања као и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљевима: испитати фреквенцу микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви, број ћелија периферне крви и процентуалну заступљеност лимфоцитних субпопулација CD3<sup>+</sup> Т лимфоцита, CD19<sup>+</sup> В лимфоцита и CD56<sup>+</sup>NK ћелија, проценат апоптотичних лимфоцита, концентрацију биохемијских параметара (протеина, холестерола и триглицерида) и концентрацију одабраних цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ ) мерених у серуму и у супернатанту фитохемаглитининим стимулисаних ћелија периферне крви код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде пре и седам дана након апликације великих доза (3.7 и 5.5 GBq) радиоактивног <sup>131</sup>I, и добијене вредности анализирати у односу на дозу апликованог <sup>131</sup>I, ретенцију <sup>131</sup>I у телу пацијента (у целом телу, тиреоидном и абдоминалном региону од интереса) и интензитет измереног оксидативног стреса.

Материјал и методологија рада подударни са наведеним у пријави дисертације и презентовани на одговарајући начин. Истраживање је дизајнирано као компаративна клиничко-експериментална студија током које су упоређивани тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника. У клиничком испитивању укупно је учествовало 24 пацијената (16 жена и 8 мушкараца), просечне старости 50.83 $\pm$ 13.22 година, који су оперисани због тумора штитасте жлезде и код којих је патохистолошки потврђена дијагноза добродиферентованог тиреоидног карцинома (папиларни или фоликуларни карцином), а упућени су у Центар за нуклеарну медицину Клиничког центра Крагујевац ради апликације радиоактивног <sup>131</sup>I након конзилијарно донете одлуке. Испитаници који су учествовали у овој студији испуњавали су све укључујуће критеријуме и нису имале ниједан искључујући критеријум. Критеријуми за укључивање у студију били су: постављена дијагноза папиларног или фоликуларног карцинома штитасте жлезде, да је пацијент оперисан и да је конзилијарно донета одлука о апликацији радиоактивног <sup>131</sup>I, хипотиреоидно стање пацијента, односно концентрација TSH већа од 30 mIU/L и потписан формулар информисаног пристанка после детаљног информисања пацијента о студији. Клиничким

испитивањем нису обухваћени пацијенти млађи од 18 година, пацијенти са акутним инфекцијама (до месец дана пре апликације  $^{131}\text{I}$ ), са раније дијагностификованим и/или леченим аутоимунским болестима, раније дијагностификованим и/или леченим хроничним инфламаторним болестима и раније дијагностификованим и/или леченим другим малигним туморима, односно особе код којих је примењена зрачна или хемиотерапија. Све посматране варијабле анализиране су у односу на контролну групу испитаника, састављену од 24 здрава добровољца, 19 жена и 5 мушкараца просечне старости  $46.37 \pm 12.79$  година, код којих раније нису дијагностификовани тумори или хроничне инфламаторне болести, и који месец дана пре узимање узорка крви нису имали акутну инфекцију са повишеном температуром, а најмање три месеца нису били изложени дејству јонизујућег зрачења у дијагностичке или терапијске сврхе.

У одељку Методе детаљно су описане све технике коришћене за анализу у студији: одређивање тиреоидног статуса ( $\text{fT}_4$ ,  $\text{fT}_3$ , TSH), тиреоглобулина (Tg) и анти-тиреоидних аутоантитела, анти-тиреоглобулинских аутоантитела (TgAt) и аутоантитела на тиреоидну пероксидазу (TPOAt), сцинтиграфија целог тела, мерење интензитета оксидативног стреса одређивањем индекса липидне пероксидације, и тоталног антиоксидативног статуса RANDOX методом, концентрације биохемијских параметара (протеина, албумина, холестерола, триглицерида и мокраћне киселине), одређивање фреквенце микронуклеуса применом CBMN теста, поступак изолације моноклеарних ћелија периферне крви уз накнадно мерење апоптозе и некрозе ћелија проточном цитометријом, и анализу субпопулација моноклеарних ћелија, анализа цитокинског профила испитаника у серумима и супернатантима митогеном стимулисане пуне крви (*whole blood assay*), као и статистичке методе коришћене за анализу резултата.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани са 21 табелом, 5 графикона и 3 слике. Генерално, показано је да код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде пре терапије радиоактивним  $^{131}\text{I}$  постоји појачан оксидативни стрес, повећана геномска нестабилност и спонтана апоптоза лимфоцита периферне крви, као и повећање лучења Th2 цитокина у одговору на неспецифичну стимулацију ћелија периферне крви фитохемаглутинином *in vitro*. Терапија  $^{131}\text{I}$  индукује повећање оксидативног стреса, генских оштећења и апоптозе, смањење броја свих целуларних елемената крви, а нарочито В лимфоцита, и смањење лучења Th2 цитокина у одговору на неспецифичну стимулацију *in vitro*.

У поглављу Дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. Резултати су дискутовани у светлу различитих па и конфликтних података о утицају терапије радиоактивним  $^{131}\text{I}$  на интензитет оксидативног стреса, концентрацију биохемијских параметара, фреквенцу микронуклеуса, проценат

апоптотичних лимфоцита, и концентрацију одабраних цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација у наслову "Промене у апоптози лимфоцита, параметрима оксидативног стреса и профилилу цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде", по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Оксидативни стрес интензиван је код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде, а примена радиоактивног I-131 индукује додатни оксидативни стрес (пораст концентрације малондиалдехида и прогресиван пад концентрације мокраћне киселине), док су промене тоталног антиоксидативног статуса незнатне;
2. Код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде повећана је геномска нестабилност, коју одражава повећана фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви. Након апликације 131-I настају додатна генетска оштећења, са повећањем фреквенце микронуклеуса и смањењем пролиферационог капацитета ћелија;
3. У односу на здраве особе, лимфоцити пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде подложнији су спонтаној апоптози. Након апликације 131-I повећава се проценат лимфоцита у раној фази апоптозе и укупан проценат апоптотичних лимфоцита;
4. Терапија 131-I праћена је смањењем броја свих целуларних елемената периферне крви при чему је на дејство јонизујућег зрачења најосетљивија популација CD19+ В лимфоцита;
5. Код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде серумске концентрације цитокина: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ , углавном су немерљиве, а терапија радиоактивним 131-I не индукује повећање њихове серумске концентрације;
6. Ћелије периферне крви пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде при неспецифичној стимулацији фитохемаглутинином *in vitro* луче веће концентрације IL-13, IL-5 и IL-9 у односу на контролну групу здравих испитаника. Терапија радиоактивним 131-I праћена је смањеним капацитетом ћелија да при неспецифичној стимулацији фитохемаглутинином *in vitro* секретују Th2 цитокине (IL-13, IL-4 и IL-5) .
7. Терапија радиоактивним 131-I праћена је променама серумске концентрације протеина и липида (смањењем серумске концентрације протеина и холестерола, праћено повећањем концентрације триглицерида).

## 2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригинални и веома важан допринос бољем познавању промена које се дешавају у лимфоцитима особа изложених познатим и великим дозама радиоактивног <sup>131</sup>I. Са аспекта практичне примене ова студија омогућава разумевање нежељених ефеката јонизујућег зрачења *in vivo*.

## 2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Коначни резултати истраживања су прихваћени за објављивање у часописима од међународног значаја.

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Олгице Михаљевић под називом "Промене у апоптози лимфоцита, параметрима оксидативног стреса и профилилу цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде" на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата др Олгице Михаљевић урађена под менторством проф. др Снежане Живанчевић Симоновић, представља оригинални научни и практични значај у испитивању *in vivo* ефеката јонизујућег зрачења насталих након примене системске радионуклидне терапије .

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом "Промене у апоптози лимфоцита, параметрима оксидативног стреса и профилилу цитокина код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде" кандидата др Олгице Михаљевић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.



## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

**Проф. др Александар Ђукић, председник**  
редовни професор за ужу научну област  
Патолошка физиологија Факултета медицинских  
наука Универзитета у Крагујевцу

---

**Проф. др Нада Пејновић, члан**  
ванредни професор за ужу научну област  
Патолошка физиологија Факултета медицинских  
наука Универзитета у Крагујевцу

---

**Проф. др Татјана Радосављевић, члан**  
редовни професор за ужу научну област  
Патолошка физиологија Медицинског факултета  
Универзитета у Београду

---

**Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић,  
члан**  
редовни професор за ужу научну област Хумана  
генетика Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу

---

**Проф. др Предраг Ђурђевић, члан**  
ванредни професор за ужу научну област  
Интерна медицина Факултета медицинских  
наука Универзитета у Крагујевцу

---