

Оцену готове докторске тезе,
доставља,-

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ

На 80. Седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, одржаној 25.9.2020.год., одлуком бр. 49/80 одређени смо у комисију за оцену готове докторске тезе ВС др Јелене Вуковић специјалисте пулмологије, запослене у Клиници за пулмологију ВМА под насловом

„ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА БРОЈА СУПРЕСОРСКИХ ЋЕЛИЈА МИЈЕЛОИДНОГ ПОРЕКЛА У КРВИ И МИКРОЦИРКУЛАЦИЈИ ТУМОРА КОД БОЛЕСНИКА СА КАРЦИНОМОМ ПЛУЋА”.

Након темељног проучавања готове докторске тезе, увидом у научни и стручни рад и разговора са кандидатом, комисија у саставу:

ВС проф др сц мед **Данило Војводић**, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; пк доц др сц мед **Слободан Аћимовић** Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; проф др сц мед **Драгана Јовановић**, Медицински факултет Универзитета у Београду; подноси Наставно научног већу МФ ВМА УО следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација је написана на **143** стране и подељена на следећа поглавља: Увод (**32** стране), Хипотеза и циљеви истраживања (**2** стране), Материјал и методе истраживања (**7** страна), Резултати (**52** стране), Дискусија (**12** страна), Закључци (**1** страна) и Литература (**29** страна). Резултати су документовани са **70** табела и **71** графиканом. У раду је цитирано **213** радова.

Истраживање у овом докторском раду обухвата области пулмологије, онкологије, молекулске медицине, клиничке имунологије и патологије и односи се на испитивање биолошких својстава супресорских ћелија мијелоидног порекла

(МДСЦ) у микроциркулацији карцинома плућа и системској циркулацији пацијента са карцином плућа и њиховом утицају на локални имунски одговор.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У Уводу кандидат наводи детаљан преглед досадашњих сазнања о имуној основи карцинома плућа, једног од водећих онколошких узрока смрти и покушајима да се бољим разумевањем улоге МДСЦ ћелија у настанку и прогресији карцинома плућа нађу потенцијални нови модалитети лечења.

Карцином плућа избегава надзор имуног система домаћина дерегулацијом инфламације. У избегавању имунске деструкције туморских ћелија развој периферне толеранције вероватно има кључну улогу. Активација и регулација специфичних Т лимфоцита стоји под контролом антиген презентујућих ћелија (АПС) и регулаторних Т лимфоцита (Трег) и улога Трег у супресији антитуморског имуног одговора одавно је позната. Међутим, поред Трег, популација ћелија мијелоидног порекла супресивних карактеристика (Myeloid Derived Suppressor Cells - MDSC) данас се у највећој мери окривљује за имуносупресију у многим малигним болестима. MDSC представљају хетерогену популацију незрелих мијелоидних ћелија које се састоје од мијелоидних прогенитора и прекурсора макрофага, гранулоцита и дендритских ћелија (DC) и одликује их способност да инхибирају различите функције Т лимфоцита. Сматра се такође да MDSC имају значајну улогу не само у избегавању имуног одговора већ и у туморској прогресији и метастазирању кроз утицај на туморску микрооколину и кроз генерисање реактивних кисеоничних врста (ROS), удружених са слободним радикалима и имунорегулаторним цитокинима који супримирају CD4⁺ и CD8⁺ Т-ћелијске одговоре.

На основу морфологије и испољавања специфичних мембранских маркера MDSC се уопштено деле у два подтипа, гранулоцитне и моноцитне MDSC.

Код људи, MDSC су идентификовани површинском експресијом CD33⁺ и недостатком експресије маркера зрелих мијелоидних и лимфоидних ћелија. Оне су типично CD11b⁺ CD33⁺⁺ CD34⁺ CD14⁻ и варирају у CD15, CD124, CD66 и експресији главног комплекса хистокомпатибилности класе II (MHC). MDSC CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺ CD33⁺ фенотипа су описани код пацијената са узнатредовалим неситноћелијским карциномом плућа (NSCLC).

Нагомилавање, експанзија и активација MDSC у тумору зависи од туморских или стромалних фактора раста, цитокина и хемокина.

Показано је да специфични Т лимфоцити не реагују на туморске антигене, што чини рани догађај у прогресији тумора. Диференцијација мијелоидних прекурсора у гранулоците, макрофаге и дендритичне ћелије често је нарушена у тумору, што доводи до акумулације MDSC. Незреле дендритичне ћелије имају мало или немају уопште експресију костимулаторних молекула (CD80, CD86 и CD40) и имају измењену продукцију IL-12. MDSC такође негативно регулишу функције NK ћелија спречавањем њихове цитотоксичне способности и производње IFN γ . Смањење броја MDSC репрограмира туморску нишу мењајући

инфламаторне одговоре, дозвољавајући имунодеструкцију тумора и стварање имунске меморије.

Ретки подаци који говоре о значају MDSC у болесника са карциномом плућа односе се на вредности ове популације у системској циркулацији. Истраживања карактеристика у микроциркулацији тумора плућа требало би да дају прецизне податке о значају MDSC у микрооколини самог тумора, односно, њихов могућ утицај на локални имунски одговор.

Из свега наведеног кандидаткиња је поставила следеће **хипотезе**:

1. Процентуална заступљеност MDSC у узорцима системске циркулације пацијената са карцином плућа је већа у односу на процентуалну заступљеност MDSC у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.

2. Процентуална заступљеност MDSC у узорцима микроциркулације тумора је већа у односу на процентуалну заступљеност MDSC у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.

3. Процентуална заступљеност MDSC у узорцима микроциркулације тумора плућа значајно се разликује од процентуалне заступљености MDSC у системској циркулацији болесника са карциномом плућа.

4. Процентуална заступљеност MDSC у узорцима системске циркулације и у узорцима микроциркулације тумора плућа корелира са патохистолошким карактеристикама и клиничким стадијумом карцинома плућа.

За проверу поставки хипотеза кандидаткиња је дефинисала следеће **циљеве истраживања**:

1. Испитати процентуалну заступљеност MDSC у периферној крви пацијената оболелих од карцинома плућа.

2. Испитати процентуалну заступљеност MDSC у узорцима микроциркулације тумора.

3. Испитати процентуалну заступљеност MDSC у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.

4. Утврдити корелацију процентуалне заступљености MDSC у периферној крви пацијената оболелих од карцинома плућа са патохистолошким типом тумора, величином тумора, нодалним статусом, присуством метастаза и клиничким стадијумом.

5. Утврдити корелацију процентуалне заступљености MDSC у узорцима микроциркулације тумора са патохистолошким типом тумора, величином тумора, нодалним статусом, присуством метастаза и клиничким стадијумом.

У поглављу **Материјал и методе истраживања** представљен је дизајн испитивања – тип студије: Клиничка опсервациона студија пресека.

Кандидат је јасно и детаљно образложио методологију истраживања које је спроведено у Клиници за пулмологију, Институту за патологију и судску медицину и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије, а након одобрења Етичког одбора Војномедицинске академије.

Уз писмени пристанак студија је урађена на узорку од укупно 64 испитаника, односно 54 пацијента са дијагностикованим карцином плућа и 10 здравих особа (контролна група) које су обавиле редован систематски преглед у ВМА и које претходно нису боловале од малигнух болести. Узорци крви и узорци микроциркулације тумора плућа за одређивање броја и карактеристика MDSCs узимани су током извођења дијагностичке бронхоскопије. Критеријум за укључење у студију био је патохистолошки дијагностикован карцином плућа код пацијената, а пре започињања онколошког лечења. Критеријуми за искључивање из студије били су: присуство других малигнух обољења, присуство аутоимунских обољења, трудноћа и употреба лекова који утичу на хематопоезу (GM-CSF) или саме МДСЦ (паклитаксел, синденафил).

Узорци микроциркулације крви тумора плућа добијени су приликом дијагностичке бронхоскопије код оних тумора којима је могло да се приступи бронхоскопом и који су на својој површини имали јасно испољене патолошке крвне судове. Аспирација узорка рађена је иглом за аспирацију кроз систем бронхоскопа у епрувету за крвну слику (са фабрички додатим антикоагулансом-натријум цитрат). Након аспирације око 3 милилитра узорка, одређивања броја вијабилних ћелија у коморици (искључивањем броја мртвих ћелија бојењем трипан плавим) и потврдног бојења на аутоматском крвном бројачу (ACT diff Beckman Coulter, USA) ћелије су даље обрађиване поступцима хипотоног лизирања и неопходних испирања (PBS). По завршетку процедура ћелије су опет избројане на наведени начин, одређен је броја вијабилних ћелија и на основу броја вијабилних ћелија подешен је број на $1 \times 10^6/\text{ml}$. Таква ћелијска популација обележавана је моноклонским антителима како је наведено у поступку одређивања фенотипске карактеризације ћелијске популације и то следећа моноклонска антитела (анти): CD15-FITC i CD15-PECy7, CD33-PE CD33-PECy7, CD45-ECD i CD45-PECy7, HLA-DR PE/Cy5, CD14-FITC, CD16-PE, CD11b-PE, CD10-PECy7, CD3-FITC, CD19-FITC and CD56-FITC (Biolegend, USA). MDSC ћелије су идентификоване имунофенотипски, поступком цитофлуориметрије.

Свим пацијентима је на почетку испитивања урађена стандардна постеро-антериорна и профилна радиографија плућа и срца, ехотомографија абдомена, компјутеризована томографија грудног коша и абдомена, бронхоскопија, а по потреби и друге дијагностичке процедуре у циљу одређивања стадијума болести (позитронска емисиона томографија, сцинтиграфија костију, компјутеризована томографија или магнетна резонанца главе, плеурална пункција, пункција перикарда са цитолошким прегледом узетог материјала) у складу са Националним водичем добре клиничке праксе за карцином плућа.

У оквиру патохистолошке анализа тумора праћени су хистолошки тип, величина, хистолошки градус, присуство лимфоваскуларне и/или перинеуралне туморске инвазије, патолошки ТНМ стадијум.

Статистичка обрада података урађена је коришћењем GraphPad Prism 5 version 5.01 софтвера. Неспарена поређења између група урађена су Студентовим t тестом и Mann-Whitney тестом. За неспарена поређења више група коришћен је

One-way ANOVA тест са накнадним Bonferroni тестом. За процену статистичке повезаности међу различитим параметрима коришћен је Pearson-ов и Spearman-ов тест корелације. Разлике су сматране статистички значајним уколико је p мањи или једнак 0.05, високо значајним уколико је p мањи или једнак 0.001 и веома високо статистички значајним уколико је p мањи или једнак 0.0001. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

Добијени резултати су показали су да:

Учесталост $CD14^+MDSC$, $CD14^+B7H4^+MDSC$, $CD14^+CD23^+MDSC$ и $CD23^+B7H4^+MDSC$ ћелија значајно је већа код пацијената са карциномом плућа у поређењу са здравим контролама;

Учесталост $CD14^+MDSC$, $CD14^+B7H4^+MDSC$, $CD14^+CD23^+MDSC$ и $CD23^+B7H4^+MDSC$ ћелија значајно је већа у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорак крви истих пацијената;

У односу на хистолошки тип тумора, болесници са ситноћелијским карциномом, аденокарциномом и сквамозелуларним карциномом плућа имали су значајно веће вредности свих испитиваних популација $MDSC$ ћелија из узорка микроциркулације тумора у односу на узорак из крви. Изузетак су болесници са крупноћелијским карциномом, код којих је удео $CD14^+MDSC$ ћелија већи у узорку крви у односу на микроциркулацију тумора;

У узорцима микроциркулације тумора пацијената са великим туморима детектована је значајно већу учесталост $CD14^+MDSC$, $CD14^+B7H4^+MDSC$, $CD14^+CD23^+MDSC$ и $CD23^+B7H4^+MDSC$ ћелија у односу на њихове узорке крви. Код болесника са малим туморима (T1, T2) вредности $CD14^+MDSC$ ћелија веће су у узорку крви у односу на микроциркулацију тумора;

Вредности $CD14^+MDSC$, $CD14^+B7H4^+MDSC$, $CD14^+CD23^+MDSC$ и $CD23^+B7H4^+MDSC$ ћелија биле су значајно веће у узорцима микроциркулације тумора у односу на узорак крви истих пацијената свих N стадијума. Са порастом N стадијума се повећавао и удео испитиваних $MDSC$ ћелија;

У обе врсте узорака пацијената без метастатске болести детектована је већа учесталост $CD14^+MDSC$, $CD14^+B7H4^+MDSC$, $CD14^+CD23^+MDSC$ и $CD23^+B7H4^+MDSC$;

Такође, у обе врсте узорака пацијената са III клиничким стадијумом детектована је већа учесталост $CD14^+MDSC$, $CD14^+B7H4^+MDSC$, $CD14^+CD23^+MDSC$ и $CD23^+B7H4^+MDSC$ ћелија.

3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу дискусија кандидат критички коментарише добијене резултате у односу на објављене резултате других студија.

Овим радом су добијени нови подаци о биолошким особинама карцинома плућа везаним за супресорске ћелије мијелоидног порекла и њиховим фенотипским и биолошким карактеристикама. Са обзиром на то да су супресорске ћелије мијелоидног порекла новооткривена и најмање истражена популација са

имуносупресивним потенцијалом, и да је њихова акумулација специфично индукована код пацијената са малигним туморима, добијени резултати пружиће драгоцене информације о њиховој повезаности са клиничким карактеристикама (током) и активношћу карцинома плућа.

Овом студијом показана је значајна повезаност броја $CD14^+B7-H4^+$ MDSC и величине тумора као и броја позитивних лимфних чворова. Такође је доказано да се карциноми плућа различитог хистолошког типа драматично разликују по капацитету да индукују повећан број $CD14^+B7-H4^+$ MDSC, што се може интерпретирати као различит имуносупресивни потенцијал. Утврђено је да су узорци туморске микроциркулације лако доступни за анализу и да су значајнији од узорака крви јер нуде сензитивније и информативније податке, прецизније рефлектујући локални баланс између туморског и имунског одговора. Стога би подаци добијени овом студијом могли имати значаја у истраживањима ефикасности имуноонколошких лекова.

4. ОБЈАВЉЕНИ РАДОВИ ИЗ ОВЕ ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ:

1. Vuković J, Karlicic V, Ristić S, Stanojević I, Nikolić N, Stefik D, Jović M, Abazović Dž, Supić G, Vojvodić D, Pavlović M. Significance of MDSC a like $CD14^+B7-H4^+$ cells frequency in blood and tumor microcirculation of lung cancer patients. *Vojnosanitetski pregled* 2020 OnLine-First Issue 00, Pages: 106-106 <https://doi.org/10.2298/VSP190430106V>

2. Vuković J, Karlicic V, Ristić S, Stanojević I, Nikolic N, Stefik D, Jovic M, Abazovic Dz, Supic G, Vojvodić D, Pavlovic M. High number of $CD14^+B7H4^+$ monocytes is significantly with increased IL-4, IL-13, IL-10 and TGF- β 1 concentration in tumor microcirculation of lung carcinoma. *Vojnosanitetski pregled* (2020); Online First April, 2020. <https://doi.org/10.2298/VSP200229043V>

ЗАКЉУЧНО МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ

Докторска теза др Јелене Вуковић из Клинике за пулмологију ВМА чија тема гласи: „ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА БРОЈА СУПРЕСОРСКИХ ЂЕЛИЈА МИЈЕЛОИДНОГ ПОРЕКЛА У КРВИ И МИКРОЦИРКУЛАЦИЈИ ТУМОРА КОД БОЛЕСНИКА СА КАРЦИНОМОМ ПЛУЋА” представља оригиналан и актуелан рад.

Рад је методолошки коректно спроведен и омогућава извођење валидних закључака. Написан је јасно, концизно и систематично. Рад садржи све неопходне делове који су адекватно укомпоновани и простор који је аутор дао појединачним поглављима одговара њиховом значају.

Добијени резултати представљају значајан допринос разумевању биолошке улоге МДСЦ у микрооколини самог тумора, односно, њиховог утицаја на локални имунски одговор код пацијената са карциномом плућа. Чланови комисије сагласни

су у закључку да докторска теза др Јелене Вуковић испуњава све предвиђене академске критеријуме и представља значајан и оригиналан допринос лечењу болесника са карциномом плућа.

Комисија једногласно предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, са обзиром на то да су испуњени сви законски услови за јавну одбрану докторске тезе, да извештај прихвати и одобри јавну одбрану докторске дисертације под називом:

„ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА БРОЈА СУПРЕСОРСКИХ ЋЕЛИЈА МИЈЕЛОИДНОГ ПОРЕКЛА У КРВИ И МИКРОЦИРКУЛАЦИЈИ ТУМОРА КОД БОЛЕСНИКА СА КАРЦИНОМОМ ПЛУЋА”

У Београду 12.11.2020.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. ВС проф др сц мед Данило Војводић, председник комије



2. Пк доц др сц мед Слободан Аћимовић, ментор и члан комије



3. Проф др сц мед Драгана Јовановић, члан комије


