

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 18.04.2019. godine, broj 9700/03-MRM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Odnos serumskih parametara sistemske inflamacije, oksidativnog stresa i lipidnog statusa kao zajedničkih biomarkera za idiopatsku plućnu fibrozu i nesitnoćelijski karcinom pluća“

kandidata dr Marine Roksandić Milenković, zaposlene u Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Dragana Jovanović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Violeta Mihailović-Vučinić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ljudmila Nagorni Obradović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Jelana Kotur-Stevuljević, Farmaceutski fakultet u Beogradu
5. Prof. dr Zorica Lazić, FMN Kragujevac

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 Marine Roksandić Milenković napisana je na ukupno 116 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 39 tabela i 17 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i izjave o autorstvu, istovetnosti i korišćenju.

U **uvodu** je definisano šta su to idiopatska plućna fibroza (IPF) i nesitnoćelijski karcinom pluća (NSCLC), etiopatogeneza bolesti, kao i faktori rizika, klinička slika, dijagnostički

pristup i terapija IPF i NSCLC. Takođe je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za ulogu serumskih parametara sistemske inflamacije, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i do sada poznatih genetskih mutacija, kako u etiopatogenezi IPF i NSCLC, tako i u kliničkom toku ovih bolesti. Navedena je detaljna klasifikacija, histološka i radiološka. Na adekvatan način su, u potpunosti, opisani aktuelni terapijski modaliteti IPF i NSCLC.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od komparativne analize IPF i NSCLC prema serumskim parametarima sistemske inflamacije, oksidativnog i lipidnog statusa. Kao i ispitivanja povezanosti ovih parametara sa funkcionalnim, kliničkim i demografskim parametrima IPF, odnosno NSCLC.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena u Klinici za pulmologiju, KCS. Istraživanjem je obuhvaćeno 30 pacijenta sa dijagnozom IPF i 115 pacijenata sa dijagnozom karcinoma pluća. Kontrolnu grupu činilo je 30 zdravih osoba, uparenih po godinama i polu sa pacijentima. Instrumenti merenja obuhvatili su demografske podatke, pušački status, respiratorne tegobe, podatke o komorbiditetima dobijene iz anamneze i dostupne medicinske dokumentacije. Uzorkovana je krv za određivanje kompletne krvne slike, serumskih parametara inflamacije (C reaktivni protein – CRP, serumski amiloid protein A1 - SAA1, sPD-L1). Takođe, analizirane su i serumske koncentracije gvožđa, TIBC, feritina, haptoglobina, alfa 1 antitripsina, vitamina B12 i vitamina D. Određivani su parametri redoks statusa (totalni oksidativni status (TOS), totalni antioksidativni status (TAS), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), superoksidni-anjon (O_2^-), produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP), lipidni hidroperoksidi (LOOH), ukupne sulfhidrilne grupe (SH-grupe), koncentracija i aktivnost enzima superksid-dismutaze (SOD)), i lipidnog statusa (koncentracije ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola, triglicerida). Parametri plućne funkcije su mereni ispitivanjem spirometrije, difuzijskog kapaciteta za ugljen-monoksid i telesne pletizmografije. Kod pacijenata sa IPF urađen je šestominutni test hodanja. Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

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 192 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata.

Oboleli od IPF, kao i oboleli od karcinoma pluća imali su značajno više vrednosti inflamatornih markera, CRP i SAA1, u odnosu na zdrave osobe; podgrupa NSCLC PD-L1+ imala je značajno više vrednosti SAA1 u odnosu na ostale obolele. Vrednost CRP, značajno je bila viša kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom, u odnosu na adenokarcinom i mikrocelularni karcinom pluća. Svi određivani parametri oksidativnog stresa (osim TOS) bili su značajno viši, a svi antioksidansi značajno niži, kod pacijenata sa IPF u odnosu na zdrave osobe. Pacijenti sa karcinomom pluća imali su značajno više koncentracije parametara oksidativnog stresa (AOPP, O₂, PAB i TOS), u odnosu na zdrave osobe i značajno niže koncentracije parametara antioksidativne zaštite (TAS i SHG). Antioksidativni indeks bio je značajno niži kod ovih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Zavisno od histoloških tipova, pacijenti sa skvamocelularnim karcinomom, imali su značajno više koncentracije AOPP, TOS i O₂ u odnosu na pacijente sa adenokarcinomom. Kod obe grupe pacijenata (IPF, karcinom pluća) postojala je značajna deficijencija vitamina D, u odnosu na referentne vrednosti. Oboleli od IPF imali su značajno niže koncentracije LDL holesterola i značajno više koncentracije triglicerida u odnosu na zdrave osobe. Oboleli od karcinoma pluća imali su značajno niže koncentracije HDL holesterola u odnosu na zdrave osobe i značajno višu koncentraciju triglicerida. Postojala je značajna razlika u koncentraciji ukupnog holesterola i HDL holesterola, između grupa EGFRwt i EGFR+ pacijenata. Oboleli od IPF imali su značajno više koncentracije sPD-L1 u poređenju sa zdravim osobama. Takođe, koncentracija PD-L1 bila je značajno viša u grupi pacijenata sa karcinomom pluća, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba. NSCLC PD-L1 + pacijenti, imali su vrednosti sPD-L1 značajno više u odnosu na sve ostale pacijente sa karcinomom pluća. Kod obolelih od IPF postoji pozitivna korelacije AOPP i vitamina D sa dužinom distance pređene tokom 6MWT, dok je korelacija sa TOS bila negativna. Žene obolele od karcinoma pluća, imale su značajno nižu koncentraciju oba inflamatornih markera, SAA1 i sPD-L1, ali i značajno nižu koncentraciju vitamina D. Kod pušača i bivših pušača, obolelih od karcinoma pluća, značajno su bile više koncentracije AOPP, u odnosu na zdrave osobe. Antioksidativni indeks je bio značajno niži kod pušača, u odnosu na zdrave osobe. Pacijenti u IV stadijumu NSCLC, imali su značajno višu koncentraciju CRP, u odnosu na pacijente u II stadijumu bolesti. Kod pacijenata sa proširenom bolešću (metastaze) značajno je bila viša koncentracija SAA1 i niža

koncentraciju HDL holesterola u odnosu na pacijente bez metastaza. Žene sa NSCLC imale su značajno niže vrednosti SAA1 od žena sa SCLC i muškaraca sa NSCLC i SCLC. Oboleli od karcinoma pluća sa većim brojem komorbiditeta, imali su značajno nižu koncentraciju vitamina D i HDL holesterola i višu koncentraciju triglicerida, u odnosu na pacijente sa manjim brojem komorbiditeta. Oboleli od IPF imali su značajno niže koncentracije PAB, O_2^- i TOS u odnosu na obolele od karcinoma pluća (svi histološki tipovi) i značajno nižu koncentraciju TAS od pacijenata sa adenokarcinomom i skvamocelularnim karcinomom pluća. Pacijenti sa IPF imali su značajno višu koncentraciju CRP u odnosu na pacijente sa adenokarcinomom pluća, a značajno nižu u odnosu na skvamocelularni i mikrocelularni karcinom pluća. Koncentracija SAA1 se nije se razlikovala između obolelih od IPF i obolelih od karcinoma pluća. Oboleli od IPF imali su značajno nižu koncentraciju vitamina D u odnosu na pacijente sa adenokarcinomom i skvamocelularnim karcinomom. Oboleli od IPF imali su značajno više koncentracije sPD-L1 u odnosu na adenokarcinom, dok se koncentracije nisu značajno razlikovale u odnosu na ostale dve grupe pacijenata sa karcinomom pluća.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ovo je prva ovakva studija, rađena na našoj populaciji. U ovom istraživanju, svi određivani parametri oksidativnog stresa, osim TOS, bili su statistički značajno viši, a svi antioksidansi statistički značajno niži u grupi pacijenata sa IPF u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Daniil i saradnici su procenjivali oksidativni stres u plazmi pacijenata sa IPF, merenjem ukupnih hidroperoksida uz pomoć spektrofotometrijske metode D-ROM. Koncentracije hidroperoksida u serumu pacijenata sa IPF su bile značajno veće u poređenju sa kontrolnom grupom. Nemoto K. i saradnici u svojoj studiji sprovedenoj kod 15 nelečenih pacijenata sa IPF pokazali su da su serumski nivoi D-ROM značajno bili povećani, a serumski nivoi BAP značajno sniženi kod pacijenata sa IPF-om u poređenju sa zdravim kontrolama. Malli i saradnici su u svom istraživanju zabeležili veće koncentracije 8-izoprostana u serumu 16 pacijenata sa IPF u poređenju sa kontrolnom grupom od zdravih osoba. Takođe, Anathi i saradnici su u svom istraživanju pokazali potencijalno novi tretman za IPF smanjenjem oksidacije proteina u plućima. Uprkos varijabilnosti primenjenih metoda i razlikama u rezultatima, podaci iz literature ukazuju da kod pacijenata sa IPF postoji povećan oksidativni stres koji je u korelaciji sa kliničkim i funkcionalnim parametrima, a u težim i rapidno progresivnim oblicima, biomarkeri oksidativnog stresa bili su značajno izmenjeni.

U ovom istraživanju pacijenti sa karcinomom pluća imali su značajno više koncentracije markera oksidativnog stresa (AOPP, O₂, PAB i TOS) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. U isto vreme, imali su i značajno niže vrednosti parametara antioksidativne zaštite (TAS i SHG). S druge strane, pacijenti sa različitim patohistološkim tipovima karcinoma imali su različite aspekte oksidativnog stresa, manje ili više izražene. Tako su pacijenti sa skvamocelularnim karcinomom pluća imali značajno više koncentracije AOPP, TOS i O₂ u odnosu na pacijente sa adenokarcinomom. Esme H i saradnici prikazali su rezultate svog istraživanja, sprovedenog kod 49 pacijenta sa karcinomom pluća, a koji su ukazivali na to da se uz napredovanje stadijuma karcinoma pluća povećavaju nivoi parametara oksidativnog stresa, dok se koncentracije parametara antioksidativne zaštite smanjuju. Pacijenti sa skvamocelularnim karcinomom imali su više izražen oksidativni stres koji se odražavao višim nivoima malondialdehida (MDA) i nitrita. Gupta A i saradnici ispitivali su nivo oksidativnog stresa kod pacijenata sa NSCLC posle primene hemioterapije. Kod pacijenata sa karcinomom pluća, bio je povećan oksidativni stres, a nivoi antioksidanasa su se smanjivali kako je bolest napredovala. Autori su zaključili da hemioterapija može suzbiti oksidativni stres i smanjiti aktivnost antioksidanasa. Antosova M. sa svojim saradnicima ispitivala je specifične markere oksidativnog stresa i oštećenja DNK i RNK, 8-hidroksiguanozin (8OHG) i 8-hidroksi-2deoksiguanozin (8OHdG), kod 40 pacijenata sa karcinomom pluća i pokazali su da je marker oštećenja DNK (8OHdG) značajno veći kod pacijenata sa karcinomom pluća nego kod zdravih ispitanika. Autori su zaključili da njihovi rezultati pokazuju mogućnost učešća azot oksida i ROS u patogenezi karcinoma pluća.

U ovoj studiji koncentracije SAA1 i CRP su bile statistički značajno više kod obe grupe ispitanika (IPF; karcinomom pluća) u odnosu na zdravu populaciju. Sung i saradnici su pronašli oko 14 puta veće koncentracije SAA, u uzorcima krvi prikupljenim od pacijenata sa karcinomom pluća u odnosu na zdrave kontrole. Sistematska evaluacija i meta-analiza Biaoxue R i saradnika, pokazale su da je povišena koncentracija SAA u serumu, u korelaciji sa dijagnozom karcinoma pluća, a posebno sa svamocelularnim karcinomom.

Pored navedenog, rezultati ove disertacije, ukazuju i na to da su povišene koncentracije sPD-L1 u serumu pacijenata sa IPF značajno veće u odnosu na zdravu kontrolnu grupu i da su koncentracije sPD-L1 kod pacijenata sa IPF značajno veće od, takođe, značajno povišenih koncentracija sPD-L1 kod pacijenata sa novodijagnostikovanim NSCLC. Podaci iz literature trenutno ukazuju da sPD-1 i sPD-L1, koji u kliničkoj praksi mogu lako da se procene, mogu da imaju veoma važnu ulogu u imunopatogenezi, kao i potencijal da ukažu na terapijske

odgovore, ne samo kod tumora, već i kod IPF i drugih autoimunih oboljenja. Može se spekulirati da sPD-1/PD-L1 mogu da budu novi biomarkeri, koji značajno utiču na potencijalne terapijske strategije, uključujući i imunološku terapiju koja se danas primenjuje kod mnogih oboljenja.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Jovanovic D, Roksandic Milenkovic M, Kotur Stevuljevic J, Ceriman V, Vukanic I, Samardzic N, et al. Soluble sPD-L1 and serum amyloid A1 as potential biomarkers for lung cancer. *J Med Biochem* 2019;38:1-10. DOI: 10.2478/jomb-2018-0036
2. Jovanovic D, Roksandic Milenkovic M, Kotur Stevuljevic J, Markovic J, Ceriman V, Kontic M, Skodric Trifunovic V. Membrane PD-L1 expression and soluble PD-L1 plasma levels in idiopathic pulmonary fibrosis - a pilot study. *J Thorac Dis* 2018;10(12):6660-6669. DOI:10.21037/jtd.2018.11.16

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Odnos serumskih parametara sistemske inflamacije, oksidativnog stresa i lipidnog statusa kao zajedničkih biomarkera za idiopatsku plućnu fibrozu i nesitnoćelijski karcinom pluća“ dr Marine Roksandić Milenković, kao prvo ovakvo istraživanje sprovedeno u našoj populaciji, a takođe jedno od prvih i u svetu, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju patofizioloških mehanizama IPF, kao i moguće zajedničke biologije sa karcinomom pluća. Ovo bi, u svetlu novih terapijskih mogućnosti kod obolelih od karcinoma pluća, moglo da implicira i potencijalne nove terapijske modalitete za IPF. Takođe, kod obe ispitivane grupe pacijenata, značajno povišeni sistemski parametri inflamacije (CRP, SAA1, sPD-L1), kao i oksidativnog stresa, mogli bi da upute na njihov značaj kao prognostičkih i/ili prediktivnih biomarkera za IPF/NSCLC.

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 Marine Roksandić Milenković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 15.05.2019.

Članovi Komisije:

Prof. dr Violeta Mihailović-Vučinić

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović

Prof. dr Ljudmila Nagorni Obradović

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević

Prof. dr Zorica Lazić

Mentor:

Prof. dr Dragana Jovanović
