

**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета У Крагујевцу, број 01-12893/3-14 од 26.11.2014. год, именовани су чланови комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата др Данијеле Јовановић под називом: **“Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигну лимфоцита периферне крви и костне сржи“**.

Чланови комисије су:

- 1. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић**- редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, председник
- 2. Проф др Небојша Анђелковић** – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина- члан
- 3. Проф др Нада Пејновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија - члан
- 4. Проф. др Биљана Михаљевић**, ванредни професор Медицинског факултета у Београду, за ужу научну област Интерна медицина-члан.
- 5. Проф др Драгана Стаматовић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина - члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Данијеле Јовановић и подноси Наставно-научном већу следећи извештај:

ИЗВЕШТАЈ

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

Тема докторске дисертације кандидата др Данијеле Јовановић под називом **“Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза**

малигних лимфоцита периферне крви и костне сржи“ урађене под менторством Проф. др Предрага Ђурђевића, ванредног професора Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицине, представља оригиналну и јединствену студију која се бави разликама у експресији прогностичких маркера и апоптозе код малигних лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије изолованих из две различите микросредине. Хронична лимфоцитна леукемија представља најчешћу леукемију одраслих која обухвата клинички и прогностички веома хетерогену групу пацијената. Зато је за даље праћење и дуже преживљавање пацијената од великог значаја већ при постављању дијагнозе одредити и вероватан ток болести. Са овим циљем су бројне студије дефинисале клиничке, биохемијске и у новије време имунофенотипске маркере. Овој проблематици је кандидат у својој докторској дисертацији приступио на јединствен начин, посматрајући прогнозне маркере и апоптозу у два различита узорка (периферна крв и костна срж) који се и најчешће срећу у клиничком раду, са циљем идентификовања разлике у наведеним параметрима, али и препознавања узорка који боље осликава могући даљи клинички ток болести.

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

Претрагом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података "*Medline*", и "*CoBSON*" помоћу следећих кључних речи: Хронична лимфоцитна леукемија, периферна крв, костна срж, прогнозни маркери, апоптоза, цитокини (CLL, peripheral blood, bone marrow, prognostic markers, apoptosis, cytokines) нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. На основу тога Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Данијеле Јовановић под насловом **“Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигних лимфоцита периферне крви и костне сржи“** представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Др Данијела Јовановић (рођ. Живић), лекар на завршној години специјализације из Интерне медицине, запослена је у Клиничком Центру Крагујевац на Клиници за хематологију од 2008 године. Запослена је као сарадник у настави на катедри Интерне медицине, Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу од 2011. године, а од 2014. године као истраживач сарадник.

Аутор је и коаутор 15 радова из области хематологије и базичних наука од чега су десет публиковани у часописима са "*SCI*" листе.

На пољу свог континуираног стручног усавшавања др Данијела Јовановић је била активни учесник на бројним међународним и регионалним симпозијумима и

конгресима посвећеним тематици у области хематологије и лабораторијских истраживања.

Од 2006. год. др Данијела Јовановић је студент Докторских академских студија-изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, модул хематологија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Тема докторске дисертације под називом “Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигнух лимфоцита периферне крви и костне сржи“ прихваћена је 2011 год. на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Поседује активно знање енглеског језика и рада на рачунару.

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

Аутор 40 научно истраживачких радова (9 ауторских, 30 коауторских радова) од којих су 19 презентовани на националним конгресима студената медицине и сродних наука и конгресима лекара са међународним учешћем (2004., 2005., 2006., 2007., 2010., 2011.), 6 презентовани на међународним конгресима лекара (Рим 2005., Охрид 2007.год., Ниш 2010., Крагујевац 2011, Барселона 2011, Даблин 2011, Будимпешта 2012), сви штампани као апстракти.

Пет радова штампано је у целини у часописима од националног значаја, од којих један ауторски и 10 штампаних у часописима од међународног значаја (9 категорија М23 и један категорије М21), од којих један ауторски.

Кандидат Данијела Јовановић, остварила је 42,5 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

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

1. **Danijela Jovanovic**, Predrag Djurdjevic, Nebojsa Andjelkovic, Ljubica Zivic. Possible role of CD22, CD79b and CD20 expression in distinguishing small lymphocytic lymphoma from chronic lymphocytic leukemia. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014; 18 (1): 29–33 (M23 – 3 бода)
2. Živić Ljubica, Ignjatović Snežana, Terzić Negra, Jakovljević Vladimir, **Živić Danijela**, Đonović Nela. Uпоредна analiza audiometrijskih i impedancmetrijskih nalaza kod radnika izloženih dejstvu industrijske buke različitog vremenskog trajanja. *Vojnosanitetski pregled* 2010; 67(3): 229-235 (M23 – 3 бода)
3. Živić Ljubica, **Živić Danijela**. Ear injuries by the parts of hearing aid. *MG* 2011; 8 (2): 287-9 (M23 – 3 бода)
4. Jelena M Vujić, Goran N Kaluđerović, Marija Milovanović, Bojana B Zmejkovski, Vladislav Volarević, **Danijela Živić**, Predrag Durđević, Nebojša Arsenijević, Srećko R Trifunović. Stereospecific ligands and their complexes. Part VII. Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid. *Eur J Med Chem*. September 2011; 46(9): 4559-4565 (M21 – 8 бода)

5. Živić Lj, **Živić D**, Đonović N. Iznenađni gubitak sluha-naša iskustva u lečenju vazoaktivnim sredstvima i kortikosteroidima. *Srp Arh Celok Lek* 2012;140(3-4):153-158 (M23 – 3 бода)
6. Ljubica Živić, Slobodan Obradović, Stevan Stojanović, Ivana Zbiljić, Vladimir Lj. Jakovljević, **Danijela Živić**, Jasmina Stojanović, Olivera Laban. Neonatal screening of hearing function by otoacoustic emissions – a single centre experience. *Vojnosanit Pregl* 2012; 69(4): 340–344 (M23 – 3 бода)
7. Zivic Lj, **Jovanovic D**. Factors that impact a choice of hearing aid to be prescribed. *Srp Arh Celok Lek* 2012;140(910):662-665 (M23 – 3 бода)
8. Zivic Lj., **Jovanovic D.**, Stojanovic S. Antrochoanal polyp of unusual size. - prihvaćen za štampu u časopisu *Medicinski glasnik* 2013;10(1):185-187. (M23 – 3 бода)
9. Vukovic VR, Baskic D, Mijailovic Ž, Đurđević P, **Jovanović D**, Mitrović S, Popović S. Association between risk factors, basal viral load, virus genotype and the degree of liver fibrosis with the response to therapy in patients with chronic HCV infection, *Vojnosanitetski Pregled* 2015;72(6) – in press (M23 – 3 бода)
10. O. Vrndic, O. Milosevic-Djordjevic, P. Djurdjevic, **D. Jovanovic**, L. Mijatovic, I. Jeftic, S. Zivancevic Simonovic. Radioiodine therapy accelerates apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with differentiated thyroid cancer *Neoplasma* 2013;60(5):568-575 (M23 – 3 бода)
11. Ana Petrovic, Ivana Nikolic, Milan Zaric, Ivanka Zelen, **Danijela Jovanovic**, Zoran Milosavljevic, Tatjana Kastratovic, Maja Colic and Marina Mitrovic. SERUM DEPRIVATION INDUCES APOPTOTIC CELL DEATH IN THE THESC CELL LINE. *Ser J Exp Clin Res* 2013; 14 (1): 23-28 (M52 – 1,5 бода)
12. Gordana Radosavljevic, Ivan Jovanovic, Katerina Martinova, **Danijela Zivic**, Nada Pejnovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. DECREASED NK CELL CYTOTOXICITY AND INCREASED T REGULATORY CELLS FACILITATE PROGRESSION OF METASTATIC MURINE MELANOMA. *Ser J Exp Clin Res* 2012; 13 (3): 85-92 (M52 – 1,5 бода)
13. Jovanović Ivan, Radosavljević Gordana, Pavlović Slađana, Zdravković Nemanja, Martinova Katerina, Knežević Milan, **Živić Danijela**, Lukić Miodrag L., Arsenijević Nebojša. Th-17 limfociti, novi učesnik u imunskom odgovoru na tumor dojke, *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2010;11(1):7-17 (M52 – 1,5 бода)
14. Đurđević P, Radovanović D, Sretenović S, Necin Jovanović Ž, **Živić D**, Simić S, Anđeković N. Burkitt's lymphoma as possible cause of acute abdomen – case report. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2008; 9(3):111-115 (M52 – 1,5 бода)
15. **Živić D**, Živančević Simonović S. Bone marrow derived macrophages: isolation and characterisation. *Medicus* 2005;6(2):77-79 (M52 – 1,5 бода)

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

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду су остали исти. Примењена методологија истраживања је идентична са одобреном.

Докторска дисертација др Данијеле Јовановић написана је на 138 стране укључујући и библиографске податке и садржи следећа поглавља: увод, циљеве студије, материјал и методе, резултате, дискусију, закључке и литературу, Рад садржи 9 табела и 75 графикона, илустрован је са 11 слика. Поглавље литература садржи 231 цитиране библиографске јединице из домаћих и иностраних стручних публикација.

У поглављу „Увод“, аутор у три подпоглавља прецизно и детаљно наводи актуелну проблематику и савремена сазнања о хроничној лимфоцитној леукемији и апоптози. Прво поглавље посвећено је хроничној лимфоцитној леукемији са посебним освртом на порекло и патогенезу малигних лимфоцита и најновијим хипотезама које потенцијално могу објаснити и хетерогеност у клиничком току пацијената. Описане су детаљно и дијагностичке процедуре, процена стадијума болести и прогнозних параметара, као и сви терапијски модалитети уз детаљно приказане критеријуме за започињање активне антинеопластичне терапије. Друго подпоглавље посвећено је механизмима апоптозе, где аутор прво истиче значај апоптозе, детаљно описује механизме апоптозе, са посебним освртом на механизме доказаног значаја у патогенези и току хроничне лимфоцитине леукемије. Треће подпоглавље на неки начин интегрише прва два, а бави се утицајем микросредине на ћелије хроничне лимфоцитне леукемије, са посебним освртом на солубилне медијаторе (citoкине).

У другом поглављу јасно су изложени циљеви истраживања као и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљевима: испитати да ли постоји разлика у експресији маркера важних за прогнозу болести (*ZAP-70*, *CD38*, *CD49d*, *bcl-2* и *mcl-1*) у зависности од тога из које микросредине потичу малигни лимфоцити ХЛЛ-а, као и да ли постоје евентуалне разлике у citoкинском профилу (*IL-4*, *IL-10*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-22*, *TNF α* , *TNF β* , *IFN γ* , *VEGF*, *FGF*) и спонтаној апоптози неопластичних лимфоцита различитих микросредина (периферна крв и костна срж). Утврђене параметре и разлике у периферној крви и костној сржи корелирати са конвенционалним прогнозним маркерима, и утврдити разлике у параметрима одређеним у плазми здравих испитаника.

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 студију је укључено укупно 30 болесника оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије којима је дијагноза постављена на основу клиничких, лабораторијских и имунофенотипских карактеристика, који у последњих 6 месеци нису примали никакву антинеопластичну терапију. Групу је сачињавало 22 мушкарца и 8 жена просечне старости 66,9 година (опсег од 53 до 87 година). Сви оболели подељени су у клиничке стадијуме по важећим критеријума *Bineta*, на групу пацијената нижег стадијума болести - *Binet A* (12 пацијента, 8 мушкараца и 4 жене, просечне старости

67,3 године) и пацијената виших стадијума болести - *Binet B и C* (18 пацијената, 14 мушкараца и 4 жене, просечне старости 66,5 година). Контролну групу сачињавало је 30 здравих испитаника сличне полне и старосне структуре (18 мушкараца и 12 жена, просечне старости 59,1 године (опсег од 33 до 77 година) који не болују од болести или стања који би могли да утичу на вредност испитиваних параметара.

У истраживање нису укључени испитаници који имају позитивне параметре биохуморалног запаљенског синдрома (C реактивни протеин, фибриноген), као и испитаници који болују од болести или стања који би могли да утичу на вредност испитиваних параметара (метаболички поремећаји, неуролошке болести, реуматолошке болести и др.) или су у акутној фази кардиоваскуларних или пулмолошких болести.

У одељку Методе детаљно су описане све технике коришћене за анализу у студији: узорковање периферне крви и костне сржи, криопрезервација леукоцита, плазме и супернатанта костне сржи, издвајање моноклеара као и последично одређивање апоптозе, одређивање експресије површинских и интрацелуларних прогнозних параметара, одређивање цитокина, као и статистичке методе коришћене за анализу резултата.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани са 4 табеле, 75 графикана и 5 слика. Генерално, показано је да се експресија CD38 и CD49d на површини лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије разликује у зависности од микросредине из које је изолован лимфоцит, али да само резултат на ХЛЛ лимфоциту из периферне крви корелира са конвенционалним прогнозним параметрима. Процент апоптотичних ћелија значајно је нижи код пацијената оболелих од ХЛЛ у односу на здраве испитанике. Присутна је разлика и у зависности од микросредине из које је изолован лимфоцит, нарочито у броју некротичних ћелија. Процент ране апоптозе лимфоцита у периферној крви најбољи је параметар апоптозе који разликује пацијенте у почетној и поодмаклој болести. Цитокински профил периферне крви и костне сржи, значајно се разликује само у концентрацији FGF-2, који је добар параметар и за разликовање пацијената у почетним стадијумима и поодмаклој болести.

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 разликама у експресији прогнозних параметара на ХЛЛ лимфоциту узоркованом из периферне крви и костне сржи, док је у цитокинском профилу и апоптози поређена не само периферна крв и костна срж оболелих пацијената, већ и периферна крв здравих испитаника.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација у наслову **“Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигних лимфоцита периферне крви и костне сржи”** 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. Експресије имунофенотипских прогнозних маркера, попут *CD49d* и *CD38*, на површини малигних ХЛЛ лимфоцита разликују се у зависности од микросредине из које су ови лимфоцити изоловани.

2. Експресија прогнозних маркера (*CD49d* и *CD38*) само на малигним лимфоцитима периферне крви корелира са стандардним прогнозним маркерима.

3. Процент Т лимфоцита виши је код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму у односу на *Binet B* и *C* клинички стадијум и има потенцијални прогнозни значај.

4. Малигни лимфоцити изоловани из костне сржи оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије подложнији су спонтаној „*ex vivo*“ апоптози у односу лимфоците изоловане из периферне крви оболелих, а обе вредности значајно су ниже у односу на спонтану апоптозу лимфоцита периферне крви здравих испитаника.

5. Процент „*ex vivo*“ спонтане ране апоптозе виши је код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму у односу на *Binet B* и *C* клинички стадијум и у корелацији је са другим прогнозним маркерима.

6. Концентрације *IL-12p70*, *VEGF*, *TNF α* значајно су ниже у плазми пацијената у односу на плазму здравих испитаника, док у концентрацијама *IL-4*, *IL-10*, *IFN γ* , *IL-22*, *IL-6*, *TNF β* , *FGF-2* нису детектоване разлике.

7. Концентрација *FGF-2* значајно је виша у супернатанту костне сржи пацијената у *Binet B* и *C* клиничком стадијуму у односу на *Binet A* клинички стадијум и у корелацији је са другим конвенционалним прогнозним параметрима.

8. Ниво експресије *bcl-2* у малигним лимфоцитима оболелих од ХЛЛ-а корелира са процентом „*ex vivo*“ апоптотичних лимфоцита у периферној крви, али не и у костној сржи.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригинални и веома важан допринос бољем разумевању „*in vivo*“ динамике ћелија хроничне лимфоцитне леукемије и утицаја микросредине и њихове интеракције на апоптозу и на испољавање прогнозних параметара. Практични значај ове докторске дисертације је у идентификовању узорка периферне крви као доминантног за одређивање експресије прогнозних маркера у односу на костну срж, што у свакодневној пракси има велики значај.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Коначни резултати истраживања биће презентовани у форми научних радова као оригинално истраживање у часописима од међународног значаја.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Данијеле Јовановић под називом **“Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигних лимфоцита периферне крви и костне сржи“** на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата др Данијеле Јовановић урађена под менторством проф. др Предрага Ђурђевића, представља оригинални научни и практични значај у испитивању прогностичких маркера и апоптозе у хроничној лимфоцитној леукемији.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом **“Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигних лимфоцита периферне крви и костне сржи“** кандидата др Данијеле Јовановић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић- редовни професор факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, председник

2. Проф др Небојша Анђелковић – ванредни професор факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина- члан

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

4. Проф. др Биљана Михаљевић, ванредни професор Медицинског факултета у Београду, за ужу научну област Интерна медицина-члан.

5. Проф др Драгана Стаматовић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина – члан

У Крагујевцу, 01.12.2014.