

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 18.03.2024. godine, broj 19/XXII-3/3-AP, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Značaj interleukina-5, interleukina-17, interleukina-33, periostina i frakcije izdahnutog azot monoksida kao biomarkera u proceni fenotipova u bronhijalnoj astmi “**

kandidata dr Aleksandre Plavšić, zaposlene u Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije. Mentor je Prof. dr Vesna Tomić Spirić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Perić Popadić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Branka Bonači Nikolić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Snežana Arandžević, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Doc. dr Rajica Stošović, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
5. Prof. dr Ivana Stanković, profesor Medicinskog fakulteta u Nišu

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 Aleksandre Plavšić napisana je na ukupno 98 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 37 tabela, 13 figura i 14 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je jasno predstavljena savremena definicija astme, kao i podela na fenotipove i endotipove. Navedena je definicija fenotipova, njihova detaljna klasifikacija prema inflamatornom i kliničkom obrascu. Opisani su inflamatorni fenotipovi u astmi dobijeni analizom indukovano sputuma. Na adekvatan način su u potpunosti opisani patofiziološki

procesu u inflamaciji, kao i značaj urođenog i stečenog imunskog odgovora u patogenezi inflamacije, glavne odlike astme.

Takođe je prikazan detaljan opis biomarkera u astmi, dosadašnja saznanja vezana za biomarkere inflamatornih fenotipova, odnosno biomarkere T2 astme i non T2 astme, sa posebnim osvrtom na eozinofile i frakciju izdahnutog azot monoksida (FeNO). Ukazano je na značaj biomarkera u svim aspektima astme. Jasno je apostrofirani savremeni koncept posmatranje fenotipova u astmi, kroz principe precizne i personalizovane medicine.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od određivanja inflamatornih fenotipova u astmi na osnovu analize indukovano sputuma, ispitivanja povezanosti potencijalnih biomarkera (eozinofili, IgE, periostin, FeNO, IL-5, IL-6, IL-17, IL-33) i inflamatornih fenotipova određenih analizom indukovano sputuma. Takođe, kao cilj rada je navedeno i ispitivanje povezanosti težine kliničke slike, težine i stepena kontrole astme sa biomarkerima (Eo, IgE, periostin, FeNO, IL-5, IL-6, IL-17, IL-33) i inflamatornim fenotipovima dobijenih analizom indukovano sputuma.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena na Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije. Detaljno su opisani kriterijumi za uključanje u studiju, kriterijumi za isključenje iz studije, i način određivanja procene kontrole astme. Upitnici koji su korišćeni u studiji: test o kontroli astme (engl. Asthma control test-ACT), upitnik za kontrolu astme (engl. Asthma Control Questionnaire-ACQ), GINA (Global Initiative for Asthma) upitnik o kontroli simptoma su detaljno opisani, a pojašnjen je i način skorovanja. Opisan je način izvođenja kožnih prick testova, spirometrijskog ispitivanja plućne funkcije, impulsne oscilometrije i merenje FeNO, kao i postupak uzorkovanja i analiza indukovano sputuma. Jasno su navedeni kriterijumi definisanja 4 inflamatorna fenotipa astme: eozinofilna astma (EA), neutrofilna astma (NA), mešovita granulocitna astma (MGA) i paucigranulocitna astma (PGA). Takođe, opisan je način uzorkovanja i određivanja serumskog nivoa IL-5, IL-6, IL-17A, IL-33, periostina i IL-8. Detaljno su opisane primenjene metode statističke analize podataka. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odluke 1322/V-4). Svi pacijenti su dali pisani informisani pristanak pre uključanja u studiju.

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 217 reference.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije “Značaj interleukina-5, interleukina-17, interleukina-33, periostina i frakcije izdahnutog azot monoksida kao biomarkera u proceni fenotipova u bronhijalnoj astmi“, autora dr Aleksandre Plavšić, utvrđeno je ukupno podudaranje teksta koje iznosi 15%(Similarity index). Ovaj stepen podudarnosti posledica je citata, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, tzv. opštih mesta i podataka, dok 4% podudarnosti proističe iz prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

## **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Ispitivanje demografskih karakteristika je pokazalo da su pacijenti dominantno ženskog pola, više od polovine su bili pušači i prekomerno uhranjeni, da je prosečno trajanje astme bilo 7 godina, sa alergijskim rinitisom kao najčećim komorbiditetom. Bilošku terapiju je primalo 17 od 80 pacijenata. Nekontrolisana astma procenjena GINA upitnikom o kontroli simptoma, ACT i ACQ je utvrđena kod manje od polovine ispitanika. Broj leukocita i limfocita u krvi je bio značajno viši kod loše kontrolisanih pacijenata u poređenju sa dobro kontrolisanim pacijentima prema ACQ upitniku. Kod skoro polovine ispitanika je detektovana povišena rezistencija malih disajnih puteva. Distribucija fenotipova indukovanim sputumom je pokazala da su dominantni fenotipovi EA, prisutna kod 31% ispitanika i MGA, prisutna kod 30% ispitanika. Inflamatorni fenotipovi astme su se značajno razlikovali prema MEF75, koji je bio najviši u MGA. Nije utvrđeno da postoji razlika inflamatornih fenotipova u biomarkerima (IgE, FeNO, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33). Inflamatorni fenotipovi se nisu razlikovali ni prema stepenu kontrole bolesti procenjene upitnicima o kontroli astme. Utvrđeno je da je broj eozinofila najviši u EA, značajno viši nego u NA, MGA i PGA. Vrednosti eozinofila u krvi od  $\geq 240/\mu\text{L}$ , sa

64%senzitivnosti i 72.7% specifičnosti su identifikovali EA (area under ROC curve=74.3%, p=0.001). Karakteristike koje su bile nezavisno povezane sa EA su bile dim kao okidač pogoršanja, niže vrednosti MEF25 i viši CRP. Neutrofilna astma je bila nezavisno povezana sa IL-8, a viši MEF50 sa MGA. Broj eozinofila je bio značajno veći u EA odnosu na NA, MGA i PGA kod ispitanika bez biološke terapije, a značajno veće vrednosti IL-17A su uočene u EA u odnosu na NA i PGA, takođe kod ispitanika bez biološke terapije. IL-5 je bio veći kod pacijenata sa EA na biološkoj terapiji u odnosu na pacijente sa EA bez biološke terapije. Koncentracije IL-5, IL-6 i IL-8 su bile veće kod pacijenta sa MGA na biološkoj terapiji, a broj leukocita i neutrofila je bio veći kod pacijenata sa MGA bez biološke terapije.

#### **D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Određivanje fenotipova je ključno u savremenom konceptu dijagnoze astme i u evaluaciji pacijenata sa astmom, jer se na osnovu precizne identifikacije fenotipova donose odluke koje se tiču odabira terapije, naročito kod pacijenata sa teškom astmom. Inflamatorni fenotipovi se mogu odrediti na različite načine, a indukovani sputum je zlatni standard, ali se zbog zahtevnosti izvođenja same procedure retko primenjuje u svakodnevnom radu. Analiza osnovnih karakteristika ispitanika je pokazala predominaciju ženskog pola što je u skladu sa podacima iz literature (Schatz M i sar.,2003, Shah R i sar.,2018). Nešto više od polovine pacijenata (56.3%) su bili pušači, što je nešto više u odnosu na podatke iz literature, prema kojima se prevalenca pušača kreće od 10 do 40 % (Gibson PG, 2009). Više od polovine naših ispitanika je bilo prekomerno uhranjeno, što je značajno više u odnosu na literaturne podatke (Akinbami LJ i sar.,2016). Najčešći komorbiditeti su bili alergijski rinitis, alergije na lekove, nealergijski rinitis, kardiovaskularna oboljenja, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (Rogliani P i sar., 2023, Massoth L i sar., 2019). Alergijski rinitis, bronhijalna astma i alergija na lekove su bili najučestalije bolesti u porodičnoj anamnezi, što je pokazano u istraživanjima o značaju porodičnog opterećenja alergijske kijavice i bronhijalne astme (Ly NP i sar., 2007, Sheikh SI i sar., 2016). Prema ACQ, broj leukocita i limfocita je bio značajno viši kod loše kontrolisanih pacijenata u poređenju sa dobro kontrolisanim, a ACT upitnikom je pokazano da pacijenti sa lošom kontrolom bolesti imaju najviši broj limfocita u poređenju sa pacijentima sa umerenom i dobrom kontrolom bronhijalne astme, što je u saglasnosti sa drugim istraživanjima (Coskun O i sar., 2021, Zhang XY i sar., 2014).

Analiza indukovano sputuma je pokazala skoro ujednačenu učestalost EA fenotipa (31%) i MGA (30%). Najveća učestalost EA je u skladu sa rezultatima drugih autora, a distribucija

ostalnih fenotipova se razlikuje u istraživanjima (Simpson JL i sar., 2010, Crespo-Lessmann A i sar., 2023, Ntontsi P i sar., 2017, Suarez-Cuartin G i sar., 2016). Nije utvrđena razlika između 4 inflamatorna fenotipova u osnovnim demografskim karakteristikama, laboratorijskim parametrima i primenjenoj terapiji, što je i zaključak istraživanja drugih autora (Crespo-Lessmann A i sar., 2023, Gao W i sar., 2020). Međutim, pokazano da se EA razlikuje po većoj učestalosti atopije, slabijoj kontroli bolesti i većim stepenom bronhijalne hiperreaktivnosti u odnosu na PGA (Schleich FN i sar., 2013). Kontrola astme procenjena ACT, ACQ i GINA upitnikom o kontroli simptoma nije pokazala ujednačenost u sve tri skale analizom pojedinačnih fenotipova. Ovaj rezultat ukazuje na potrebu da se jasno i precizno utvrdi sama definicija kontrole astme i definišu upitnici, što je u skladu sa konceptom savremenog posmatranja kontrole astme (Canonica GW i sar., 2022).

Utvrdili smo da je najveća vrednost MEF75 uočena u MGA. Više od polovine ispitanika je imalo povišene otpore u malim disajnim putevima i to najučestalije u EA, zatim u MGA, ali bez razlike između fenotipova. Naši rezultati su u saglasnosti sa publikovanim istraživanjima, u kojima je pokazana povezanost disfunkcije malih disajnih puteva sa inflamatornim fenotipovima, kao i povezanost lošijih parametara disfunkcije malih disajnih puteva u EA i MGA (Abdo M i sar., 2022). Naše istraživanje je pokazalo da je broj eozinofila značajno veći u EA u odnosu na ostale fenotipove. Nismo pokazali korelaciju između broja eozinofila u serumu i procenta eozinofila u sputumu u EA. U drugim istraživanjima je pokazano da eozinofilija u serumu koreliše sa eozinofilima u sputumu (Westerhof GA i sar., 2015, Wagener AH i sar., 2015, Yap E i sar., 2013). Međutim, ne postoje usaglašeni stavovi o tome koja vrednost eozinofila u krvi je povezana sa eozinofilima u sputumu, kao što ne postoje ni jedinstveni stavovi i vodiči o tome koji procenat eozinofila u sputumu tačno definiše eozinofilni fenotip. Utvrdili smo da vrednosti eozinofila  $\geq 240/\mu\text{l}$  identifikuju pacijente sa EA, sa 64% senzitivnosti i 72.7% specifičnosti, što je u skladu sa rezultatima i drugih autora (Schleich FN i sar., 2013). Nije utvrđena razlika između inflamatornih fenotipova u biomarkerima: IgE, periostin, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-33, što ukazuje na kompleksnosti raznovrsnih i složenih imunoloških interakcija T2 i non T2 fenotipova. Inflamatorni fenotipovi se nisu razlikovali prema vrednostima FeNO, što je pokazano i kod drugih istraživača (Petsky HL i sar., 2018, Korevaar DA i sar., 2015, Hastie AT i sar. 2013). Karakteristike EA su bile veći broj egzacerbacija u poslednjih godinu dana, dim kao okidač pogoršanja, primena nazalnih glikokortikoida, niže vrednosti MEF25 i MEF50, više vrednosti CRP i periostina. Naši rezultati su u saglasnosti sa drugim istraživanjima u kojima je takođe utvrđeno da se EA odlikuje lošijom

kontrolom bolesti, većim vrednostima periostina i CRP ( Schleich FN i sar., 2013, Ciolkowski J i sar., 2019, Shimoda T i sar., 2015, Ali H i sar., 2023, Gibson PG i sar., 2019). Pacijenti sa NA u našem istraživanju su imali veći nivo IL-8, koji bio nezavistan faktor povezan za NA. Povećana ekspresija IL-8RA i IL-8RB gena, kao i IL-8 u NA je demonstrirana i u drugim istraživanjima, ali je pokazano da se NA karakteriše i povišenim vrednostima CRP i IL-6 (Wood LG i sar., 2012). Prema našim rezultatima MGA se od ostalih fenotipova razlikovao prema prisustvu alergijskog rinitisa u porodici, fizičkim naporom kao okidačem pogoršanja, primenom alergijske imunoterapije, višim FEV1/FVC, MEF50 i MEF75, dok je jedina karakteristika nezavisno povezana sa MGA bila viša vrednost MEF50. Naši rezultati su u suprotnosti sa drugim istraživanjima, u kojima se MGA odlikovao lošijom plućnom funkcijom (Abdo M i sar., 2022, Deng K i sar., 2021). Razlog za ovakav nalaz možda se može sagledati u primeni biološke terapije kod 6 od 24 pacijenata sa MGA, koja je mogla uticati na parametre plućne funkcije.

Naše istraživanje nije utvrdilo korelaciju biomarkera ni sa jednim upitnikom o kontroli bolesti, bez obzira na inflamatorni fenotip, što je u skladu sa publikovanim radovima (Schleich F i sar., 2014, Brisk R i sar., 2016). Rezultati da se EA kod pacijenta bez biološke terapije odlikuje najvećim brojem eozinofila u serumu je u skladu sa celom kohortom. Međutim, nalaz povišenog nivoa IL-17A kod pacijenata sa EA bez biološke terapije je interesantan. Ovaj rezultat može sugerisati da su naši pacijenti sa EA bez biološke terapije imali mešoviti Th2/Th17 fenotip, čije je postojanje jasno definisano u istraživanjima (Cosmi L i sar., 2010, Ervin C i sar., 2014). Pokazali smo da je IL-5 bio značajno veći kod pacijenta sa EA koji su bili na biološkoj terapiji, što govori u prilog složenih patofizioloških mehanizama unutar fenotipa EA. Analiza 68 pacijenata sa teškom EA je pokazala da je njih 30 prešlo na drugu biološku terapiju nakon 21 meseca, što sugerise da postoje pacijenti koji ne odgovaraju na inicijalnu biološku terapiju i kod kojih postoji mogućnosti promene imunološkog odgovora unutar samog fenotipa (Caminati M i sar., 2023). Naši rezultati su pokazali da pacijenti sa MGA na biološkoj terapiji imaju veći nivo IL-5, IL-6, IL-8, a oni bez biološke terapije imaju veći broj leukocita i neutrofila, što ukazuje na dominantnu neutrofilnu inflamaciju i sugerise korekciju terapijskog pristupa.

#### **E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

Plavsic A, Nikolic BB, Milenkovic B, Miskovic R, Kusic N, Dimitrijevic M, Arandjelovic S, Milosevic K, Buha I, Spiric VT. **Asthma inflammatory Phenotypes: How Can We Distinguish Them?** J Clin Med.2024;13(2):526. doi: 10.3390/jcm13020526. M22, IF 3.9

## **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Značaj interleukina-5, interleukina-17, interleukina-33, periostina i frakcije izdahnutog azot monoksida kao biomarkera u proceni fenotipova u bronhijalnoj astmi“ dr Aleksandre Plavšić, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju inflamatornih fenotipova astme i biomarkera u astmi, kao savremenog koncepta evaluacije pacijenata sa astmom. Posebno je ukazano na značaj određivanja inflamatornih fenotipova analizom indukovano sputuma, kao bitnog pokazatelja informacija o inflamaciji, ključnoj odlici astme. Pokazana je distribucija inflamatornih fenotipova astme analizom indukovano sputuma u našoj populaciji i na sveobuhvatan način su prikazane ključne karakteristike svakog pojedinačnog fenotipa. Povezanost eozinofila u serumu kao markera EA, kod pacijenata sa i bez biološke terapije, pruža značajan praktičan zaključak i ukazuje na moguću primenu ovog biomarkera u svakodnevnom radu. Takođe, rezultati pokazuju značaj IL-17A kao potencijalnog biomarkera pacijenata sa EA bez biološke terapije, a IL-5 kao potencijalnog biomarkera pacijenata sa EA na biološkoj terapiji. Ovi rezultati ukazuju na kompleksnosti patofizioloških odlika EA, najučestalijeg inflamatornog fenotipa i značajni su u doprinosu razumevanja složenih patogenetskih procesa u ovom inflamatornom fenotipu. Rezultati ovog rada su značajni u apostrofiranju personalizovanog i holističkog pristupa pacijenata sa astmom, sa ciljem ranog identifikovanja fenotipova analizom indukovano sputuma, ukazuju na značaj analize kliničkih karakteristika i biomarkera, povezanosti biomarkera sa inflamatornim fenotipovima, a sve u svrhu određivanja individualnog pristupa u lečenju. Posebna važnost ove doktorske disertacije odnosi se u doprinosu razmatranja primene analize indukovano sputuma u svakodnevnoj kliničkoj praksi, kao vrlo bitne metode u proceni fenotipova i na osnovu koje se mogu donositi odluke o lečenju pacijenata sa astmom, uključujući i one sa teškom astmom. 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 Aleksandre Plavšić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.03.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandra Perić Popadić

---

Prof. dr Branka Bonači Nikolić

---

Doc. dr Snežana Arandjelović

---

Doc. dr Rajica Stošović

---

Prof. dr Ivana Stanković

---

Mentor:

Prof. dr Vesna Tomić Spirić

---