

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду–Фармацеутског факултета одржаној 07.03.2024. године, донета је Одлука број 521/2 којом су именовани чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата дипл. фармацеута-медицинског биохемичара Вере Р. Миловановић, под насловом:

### **„Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије“**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

1. Др сц. Снежана Јовичић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет, председник Комисије
2. Др сц. Неда Милинковић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет,
3. Др сц. Зорица Лазић, редовни професор у пензији, Медицински факултет, Универзитет у Крагујевцу
4. Др сц. Мила Љујић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

Чланови Комисије су прегледали приложену дисертацију и подносе Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета, следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Докторска дисертација кандидата Вере Р. Миловановић под називом **„Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа“** написана је на 99 страна, стандардног формата са једноструким проредом и фонтом *Times New Roman* величине 12. Садржај докторске дисертације је изложен у следећим поглављима: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Садржи 26 слика, 33 табела и 218 референци. На почетку дисертације приложени су сажетци на српском и енглеском језику, а на

крају се налазе одговарајући прилози докторској дисертацији: списак публикованих радова који чине део докторске дисертације, кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске дисертације и коришћењу докторске дисертације.

У *Уводу* су изнете информације значајне за предмет проучавања докторске дисертације. Разматрања која се наводе односе се на етиологију и дијагностику хроничне опструктивне болести плућа (ХОБП). Објашњена је улога и значај алфа-1-антитрипсина (ААТ) у појави хроничне опструктивне болести плућа, кроз објашњење његовог механизма деловања, као и на основу познатих чињеница о фенотиповима ААТ. Такође, наведена је улога ензима метионин сулфоксид редуктазе А (МСРА), у редукцији протеина и потенцијални значај у настанку ХОБП. Поред тога, доведени су у везу ААТ и полиморфизам МСРА.

*Циљеви истраживања* су јасно дефинисани и у складу са одобреним, приликом пријаве тезе. Главни циљеви су били да се испита значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа. Истовремено, циљ је био да се одреди утицај пола, година старости и статуса пушења на ниво имунореактивног ААТ, на ниво оксидованог ААТ и других параметара функционалне активности ААТ, односно специфичне инхибиторне активности ААТ према еластази (СИА-еластаза), специфичне инхибиторне активности ААТ према трипсину (СИА-трипсин), антиеластазне и антитрипсинске активности, у настанку и прогресији ХОБП. Такође, планирано је да се испита утицај фенотипова ААТ на ниво оксидованог ААТ и на параметре функционалне активности ААТ. Циљ је био анализа утицаја полиморфизма МСРА rs10903323 на ниво оксидованог ААТ и параметаре функционалне активности ААТ. Поред тога, циљ је био да се испита истовремени утицај фенотипа ААТ и полиморфизма МСРА rs10903323 на појаву и развој ХОБП. Студија је испитивала који од анализираних параметара представљају независне предикторе за појаву ХОБП.

У поглављу *Материјал и методе* описани су процес одабира пацијената, критеријуми за искључивање из испитивања испитаника, као и врсте узорака који су анализирани.

Истраживањем је обухваћено 155 пацијената са дијагнозом хроничне опструктивне болести плућа (ХОБП) и 134 здрава испитаника, који су чинили контролну групу. За учеснике студије били су познати антропометријски подаци, као и пол, старост и статус пушења. Процена тежине болести код пацијената је вршена мерењем спирометријских параметара: форсирани експираторни капацитет у првој секунди (ФЕВ1), форсирани витални капацитет (ФВЦ) и израчунаван је однос ФЕВ1/ФВЦ. Потом су пацијенти класификовани у групе према тежини

болети применом ГОЛД критеријума. Код испитаника је одређиван утицај пола, старости и статуса пушења на ниво имунореактивног ААТ, оксидованог ААТ, као и на параметре функционалне активности ААТ. Концентрација имунореактивног ААТ у серуму испитаника одређивана је имунотурбидиметријском методом. Функционална активност ААТ је одређивана помоћу параметара еластаза инхибиторног капацитета (ЕИЦ) и трипсин инхибиторног капацитета (ТИЦ) кинетичком методом мерења ензимске активности, помоћу одговарајућих супстрата. Оксидовани ААТ (изражен у % и g/L) је одређен на основу разлике између инхибиторне активности нормалног и оксидованог ААТ према трипсину и еластази, коришћењем одговарајуће једначине. За одређивање антиеластазне и антитрипсинске активности коришћене су одговарајуће једначине. Специфична инхибиторна активност ААТ према еластази (СИА-еластаза) и специфична инхибиторна активност ААТ према трипсину (СИА-трипсин), су параметри изведени из еластаза инхибиторног капацитета и трипсин инхибиторног капацитета на грам имунореактивног алфа-1-антитрипсина. Фенотип ААТ из узорака серума испитаника одређиван је методом изоелектрофокусирања на ултра-танком полиакриламидном гелу, при рН градијенту од 4,2 до 4,9. Применом методе умножавања циљаног фрагмента дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) ланчаном реакцијом ДНК полимеразе (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), а потом применом рестрикционог ензима детектоване су генетске варијанте МСРА ензима из узорака пуне крви.

У поглављу **Резултати** приказани су оригинални резултати добијени у оквиру докторске дисертације. Резултати су приказани кроз 26 слика и 33 табеле, у оквиру 5 поглавља и потпоглавља.

**Дискусија** обухвата анализу добијених резултата са посебним критичким освртом на резултате и закључке сличних студија доступних у литератури.

У **Закључку** су по ставкама наведени најважнији закључци који произилазе из добијених резултата истраживања, као и анализе њиховог међусобног поређења, а који на адекватан начин одговарају на постављене циљеве ове докторске дисертације

У **Литератури** су наведене 218 цитиране библиографске јединице из иностраних и домаћих стручних публикација коришћених у овој докторској дисертацији.

**Биографија** садржи кратку биографију кандидата Вере Р. Миловановић.

## Б. ОПИС ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА

У овој докторској дисертацији добијен је повишен укупни серумски ниво ААТ и ниво оксидованог ААТ (% , g/L), код пацијената са ХОБП у односу на здраве. Анализирани параметри функционалне активности, СИА-еластаза, СИА-трипсин и антитрипсинска активност, добијени су значајно нижи код пацијената у односу на контролну групу. Добијена је негативна корелација између СИА-еластазе и оксидованог ААТ (g/L) у контролној групи и код пацијената. У контролној групи је добијена значајна позитивна корелација између СИА-еластазе и антиеластазне активности, као и значајна негативна корелација између СИА-еластазе и оксидованог ААТ (%), и СИА-трипсина и оксидованог ААТ (g/L). Добијен је виши ниво оксидације ААТ, а параметри функционалне активности ААТ (СИА-еластаза, СИА-трипсин,) били су снижени код пацијената пушача у односу на пацијенте непушаче. У групи пушача, значајно ниже вредности СИА-еластазе и СИА-трипсина имали су ХОБП-пацијенти у односу на контролну групу. Такође у групи пушача, добијен је значајно виши ниво укупног ААТ и оксидованог ААТ (% , g/L) код ХОБП-пацијената у односу на контролну групу. Када су испитаници подељени на три категорије према пушачком статусу (пушачи, бивши пушачи, непушачи), у групи пацијената пушачи су имали значајно вишу вредност оксидованог ААТ (g/L) у односу на бивше пушаче, док им је вредност СИА-трипсина била значајно нижа. У групи ХОБП пацијената пушача, мушкарци су имали нижу вредност СИА-трипсина у односу на жене, са граничном значајношћу, док у у групи ХОБП непушача, мушкарци су имали значајно нижу вредност индекса ФЕВ1/ФВЦ у односу на жене. Резултати су показали да су пацијенти непушачи који су били у групи ГОЛД3+4 имали значајно нижу вредност СИА-еластазе у односу на здраве непушаче. Такође, најниже вредности СИА-еластазе добијене су код пацијената са тешким и веома тешким обликом болести, а то је било значајно ниже него код здравих пушача и непушача. Насупрот томе, ХОБП-пушачи са ГОЛД3+4 стадијумом болести имали су виши ниво оксидованог ААТ (%) у поређењу са свим другим испитиваним групама, односно у односу на здраве непушаче, у односу на здраве пушаче, у односу на ГОЛД2 пушаче и у односу на ГОЛД3+4 непушаче.

Одређивање фенотипова ААТ рађено је изоелектричним фокусирањем а испитивање *Hardy-Weinbergove* равнотеже је показало да фреквенце анализираних фенотипова и алела нису биле равнотежи, како у контролној групи тако ни у групи пацијената. Испитивањем учесталости појединих алела и фенотипова, није показана разлика између контролне групе и пацијената са ХОБП. Када су фенотипови ААТ подељени на недефицијентне (ММ, МФ) и дефицијентне (МС, МЗ, СЗ) добијена је већа учесталост дефицијентних фенотипова ААТ у

групи ХОБП пацијената у односу на контролну групу. Када је упоређена дистрибуција нормалних (ММ) и мутираних (МФ, МС, МЗ, СЗ) фенотипова ААТ између контролне групе и групе ХОБП-пацијената добијена је значајно већа учесталост мутираних фенотипова ААТ у групи ХОБП пацијената у односу на контролну групу. Код испитаника са недефицијентним ААТ фенотиповима, вредности за СИА-еластазу, СИА-трипсин и антитрипсинску активност биле су значајно ниже код ХОБП-пацијената у односу на контролну групу. У групи ХОБП-пацијената добијена је значајно нижа концентрација ААТ и антитрипсинска активност код носилаца дефицијентних фенотипова у односу на недефицијентне. Анализом заједничког утицаја статуса пушења и фенотипа ААТ, у групи ХОБП пацијената са дефицијентним фенотиповима, пушачи су имали значајно нижу вредност СИА-еластазе и СИА-трипсина у односу на непушаче. У групи пушача, вредност за СИА-трипсин била је значајно нижа код ХОБП-пацијената у односу на здраве испитанике, независно од тога да ли су били носиоци недефицијентних ААТ или носиоци дефицијентних фенотипова. Студија је показала да су у обе групе испитаника (ХОБП-пацијенти и контролна група), носиоци дефицијентног фенотипа ААТ имали значајно ниже вредности антитрипсинске активности у односу на носиоце недефицијентног фенотипа. Испитивањем утицаја година старости и фенотипа ААТ на спирометријске параметре добијено је да је у групи пацијената носилаца недефицијентног ААТ фенотипа (ММ, МФ) била значајно нижа вредност ФЕВ1 код испитаника млађих од 60 година у односу на старије од 60 година. У групи носилаца недефицијентног ААТ фенотипа пацијенти млађи од 60 година имали су значајно нижу вредност индекса ФЕВ1/ФВЦ у односу на старије од 60 година. Такође, утврђен је значајно нижи ФЕВ1/ФВЦ индекс у групи испитаника млађих од 60 година код носилаца недефицијентних у односу на носиоце дефицијентних ААТ фенотипова.

Поређењем учесталости анализираних генотипова МСРА rs10903323 није уочена статистички значајна разлика између контролне групе и пацијената. Такође, није било разлике у расподели носилаца мутације МСРА (генотипови АГ и ГГ) и оних који нису били носиоци мутације (генотип АА) између контролне групе и пацијената са ХОБП. Фреквенце анализираних генских варијанти у контроли и код ХОБП-пацијената су биле у *Hardy-Weinberg*-овој равнотежи. Када су пацијенти подељени према тежини болести на три групе (средње тешки облик-ГОЛД2, тешки облик-ГОЛД3 и врло тешки облик-ГОЛД 4), као и када су подељени на две групе (лакши-ГОЛД 2 и тежи облик-ГОЛД 3+4), није утврђена разлика у дистрибуцији АА и АГ генотипова. Испитивањем интеракције МСРА генотипа и пушења, у групи пацијената пушача добијен је значајно виши ниво оксидованог ААТ (%) код носилаца АГ у односу на АА генотип. Испитивање утицаја МСРА генотипа и пушачког статуса, на

ниво оксидације ААТ код пацијената подељених према тежини болести је показало да су пацијенти пушачи са тешким и врло тешким обликом болести (ГОЛД3+4) носиоци Г алела имали значајно виши оксидовани ААТ (% $, g/L$ ) у односу на АА хомозиготне. Анализом утицаја година старости и генотипа на спирометријске параметре код пацијената, добијено је да су испитаници женског пола носиоци АГ генотипа имали значајно нижу вредност ФВЦ уколико су старији од 60 година у односу на млађе од 60 година. У групи носилаца АГ генотипа млађих од 60 година мушкарци су имали значајно нижу вредност ФВЦ у односу на жене. Жене старости до 60 година имале су значајно нижи ФВЦ у групи носилаца АА генотипа у односу на АГ генотип. Мушкарци млађи од 60 година носиоци АА генотипа имали су значајно нижу вредност ФЕВ1 у односу на старије од 60 година. Значајно нижу вредност индекса ФЕВ1/ФВЦ имали су носиоци АА генотипа млађи од 60 година у односу на старије од 60 година, како у групи жена, тако и код мушкараца.

У овој докторској дисертацији добијено је да су независни предиктори за појаву ХОБП повишен ниво оксидованог ААТ, снижен ниво СИА-еластазе, дефицијентни ААТ фенотипови и старост преко 60 година. Такође у овој студији је потврђена чињеница, да је пушење значајан независни предиктор за појаву ХОБП.

## **В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ**

Генетички фактор, за који је до сада потврђено да је фактор ризика за ХОБП, је урођена дефицијенција ААТ. Поред тога, најзначајнији средински фактор за развој ХОБП је дим цигарета [1]. Хомозиготи за 3 алел ААТ имају високу предиспозицију за рану појаву емфизема, посебно уколико су пушачи [2, 3].

У овој докторској дисертацији је очекивано добијена повишена концентрација ААТ, као реактанта акутне фазе, код пацијента оболелих од ХОБП у односу на здраве испитанике. Ово је у складу са резултатима више досадашњих истраживања. Једна студија показује значајно повишен серумски ниво ААТ код ХОБП пацијената и у складу је са повећањем броја леукоцита и вредности Ц-реактивног протеина (ЦРП) [4]. Повећана концентрација ААТ може се јавити као одговор на повећано ослобађање еластазе из активираних неутрофила, у циљу заштите ткива од протеолитичког дејства овог ензима [5]. Такеи и сарадници су у својој студији потврдили појаву повишеног нивоа ААТ код пацијената са ХОБП, који је везан за погоршање системске инфламације и повећање нивоа других инфламаторних фактора, као и већу вероватноћу за смртни исход код ХОБП пацијената који нису испуњавали критеријуме

за ААТД [6]. Такође, у једном истраживању потврђен је значајно повишен ниво ААТ у кондензату издахнутог ваздуха код пацијената са ХОБП у фази егзацербације [7].

У приказаној дисертацији вредност СИА-еластазе била је значајно нижа код ХОБП-пацијената у односу на контролну групу, док је антиеластазна активност такође била нижа, али без статистичке значајности.

Утицај дуванског дима на ниво оксидације ААТ, као водећег спољашњег фактора ризика за појаву ХОБП, потврђен је у приказаној дисертацији на основу значајно повећаног нивоа оксидације ААТ код пацијената пушача у односу на пацијенте непушаче. У докторској дисертацији је добијен значајно виши ниво оксидованог ААТ код пацијената пушача у односу на здраве пушаче, што се може објаснити интеракцијом пушења и вероватно присуством фактора инфламације, на повећање оксидативне модификације ААТ.

У приказаном истраживању добијене су значајно ниже вредности параметара функционалне активности ААТ, СИА-еластазе и СИА-трипсина, код пацијената пушача у односу на непушаче. У једној од ранијих студија, у којој је изведено испитивање *in vitro*, проучаван је утицај компоненти из цигарета на активност еластазе [8]. Резултати су показали да капацитет ААТ из хуманог серума да инхибира еластазу (ЕИЦ) значајно опада додавањем воденог раствора компоненти дуванског дима. У другој студији [9] је показано присуство метионин-сулфооксида у лаважи плућа пушача, док код непушача није био идентификован. Истоимена студија је показала опадање еластаза инхибиторног капацитета ААТ у лаважи плућа пацијената који су пушачи, за разлику од непушача. У приказаној дисертацији добијено је да су СИА-еластаза и СИА-трипсин били виши код бивших у односу на тренутне пушаче. Иако није било познато колико је времена прошло од престанка конзумирања цигарета, значајно нижа вредност оксидованог ААТ (g/L) може да укаже на значај прекида пушења. Студија Маннино и сарадника показала је да је опадање плућне функције брже код пушача него код бивших пушача, у периоду праћења од три године [10]. Такође, у истој студији показано је да је ризик од опадања функције плућа код бивших пушача једнак оном који је добијен код испитаника који никада нису пушили.

Добијени резултати ове докторске дисертације, у групи пацијената, су показали ниже вредности ФЕВ1/ФВЦ индекса код мушкараца у односу на жене, са граничном значајности. Приказана дисертација је показала да су у групи ХОБП-пацијената мушкарци пушачи имали нижу вредност СИА-трипсина у односу на жене пушаче, док је у групи ХОБП пацијената непушача показано да су мушкарци имали значајно нижи индекс ФЕВ1/ФВЦ у односу на жене. Опадање ФЕВ1 код мушкараца са ХОБП показано је у једној студији, где се опадање

плућне функције доводи у везу са повећањем броја цигарета који се конзумира и са гојазношћу [11]. Ранијих година се сматрало да је ХОБП више заступљена код мушкараца [12]. Новија истраживања показују да су жене у већој мери осетљиве на појаву ХОБП од мушкараца, посебно када су у питању пушачи [13, 14, 15]. Према истраживањима спроведеним у САД, смртност код жена од последица ХОБП у односу на мушкарце, је у порасту [16]. Ова докторска дисертација је показала да су у групи ХОБП-пацијената мушкарци пушачи имали нижу вредност СИА-трипсина у односу на жене пушаче, док је у групи ХОБП пацијената непушача показано да су мушкарци имали значајно нижи индекс ФЕВ1/ФВЦ у односу на жене.

Значајан део ове студије је анализа фенотипа ААТ код пацијената са ХОБП и здравих испитаника. Резултати показују да су у контролној групи, као и у групи пацијената фреквенце анализираних фенотипова одступале су од *Hardy-Weinbergove* равнотеже. До оваквог исхода може доћи услед више различитих фактора [17]. У докторској дисертацији одступање од *Hardy-Weinbergove* равнотеже у контролној групи је последица значајно веће учесталости М3 хомозигота од очекиване, а у групи ХОБП пацијената добијена је већа учесталост М23 хетерозигота у односу на очекивану. У студији Јелић-Ивановић и сарадника [18] спроведеној у општој популацији Србије, такође је добијено одступање од Н-В равнотеже, услед веће учесталости М1, М2 и М3 хомозигота и мање учесталости М1М2 и М1М3 хетерозигота од очекиваних. Резултати приказане дисертације су делимично у сагласности са овом студијом, у погледу узрока одступања од Н-В равнотеже, а то је већа учесталост М3 хомозигота, од очекиване. Анализа дистрибуције дефицијентних ААТ алела у овој докторској дисертацији показала је код ХОБП пацијената учесталост З алела од 3,6% и С алела од 1,9%; у контролној групи, учесталост З алела је била 1,6% и С алела 0,8%. Ови последњи резултати добијени за учесталост дефицијентних ААТ алела код здравих испитаника у контролној групи су у складу са резултатима студије Јелић-Ивановић и сарадника [18], спроведеној у општој популацији Србије пре три деценије, која је обухватила 1060 испитаника, када је добијена учесталост за З алел од 1,3% и С алел 0,7%. У дисертацији нису детектовани пацијенти носиоци З хомозиготног фенотипа, за разлику од студије Топић и сарадника [19], спроведене у популацији Србије где је добијена учесталост З хомозигота била 2,9% код ХОБП пацијента. Такође, учесталост М3 хетерозигота код пацијената у овој дисертацији је била 6,1%, док је наведеној студији Топић и сарадника [19] код ХОБП-пацијената добијено 8,3% М3 хетерозигота. Код здравих, у наведеном истраживању Топић и сарадника [19] фреквенца М3 хетерозигота је била 2,6%, што је врло слично резултату добијеном у овој докторској



дисертацији, 3,0%. Такође, учесталост МЗ хетерозигота код ХОБП пацијената, била је складу са учесталошћу добијеној у данској студији, где је износила 6,3% [20].

У докторској дисертацији је у групи пацијената код два испитаника детектовано је присуство дисфункционалне варијанте ААТ, Ф варијанте, са учесталошћу Ф алела од 0,6 %. У студији спроведеној у Србији код здравих испитаника и пацијената са ХОБП није утврђено присуство Ф алела [19]. Слично резултатима добијеној у приказаној дисертацији, у другој студији у популацији Србије [18], детектован је Ф алел са фреквенцом од 0,3%.

На основу до сада доступних научних података, у овој докторској дисертацији је по први пут испитан полиморфизам rs10903323 у гену МСРА у популацији Србије. Такође, ово је прво истраживање којим је испитана повезаност између МСРА rs10903323 полиморфизма и појаве ХОБП. Дистрибуција генотипова и алела МСРА rs1093323 добијених у популацији здравих испитаника у Србији (АА 80,5 %, АГ 18,0% и ГГ 1,5%, А алел 89,5% и Г алел 10,5%) слична је резултатима добијеним за европску популацију (АА 78,3 %, АГ 20,5 % и ГГ 1,2 %, А алел 88,12% и Г алел 11,88% ) [21]. Подаци, који су до сад доступни, показују да постоји значајна варијација у дистрибуцији МСРА rs1093323 генотипова између различитих популација. На пример, дистрибуција генотипова АА, АГ и ГГ у Источној Азији је 15,1 %, 49,2 %, 35,7 %, док је у популацији Америке 50,7 %, 32,0 %, 17,3 % [21]. Евидентне разлике у расподели генотипова између испитаника обухваћеним у студијама спроведеним на подручју Европе и Азије, највероватнија су последица генетичке варијабилности код различитих раса. У контролној групи, као и у групи пацијената фреквенце анализираних генотипова нису одступале су од *Hardy-Weinbergove* равнотеже.

У оквиру групе пацијената који су носиоци Г алела, они који су били пушачи показали су значајно виши ниво оксидованог ААТ (%) у односу на непушаче. Такође, вредност оксидованог ААТ у g/L, била је значајно виша код пацијената пушача носилаца Г алела у односу на пацијенте непушаче носиоце Г алела. У приказаној дисертацији показан је повећан ниво оксидативно модификованог ААТ (% , g/L) код пацијената пушача који су имали тежак и веома тежак облик болести (ГОЛД 3+4) а носиоци су Г алела у односу на носиоце АА хомозиготног генотипа. Значај rs10903323 МСРА полиморфизма проучаван је у појединим болестима које у основи патогенезе имају инфламацију, као и ХОБП. У шпанској студији, Г алел је идентификован као фактор ризика за појаву исхемијске болести срца код пацијената са реуматидним артритисом [22]. Такође, студија Мартин и сардници је показала да је МСРА rs10903323 полиморфизам повезан са повећањем оксидативног стреса и да је укључен у патогенезу реуматоидног артритиса [23]. Студија спроведена у Кини показала је да МСРА

рс10903323 АГ генотип утиче на појаву реуматоидног артритиса, посебно код старијих, ЦРП-позитивних пацијената (вредност ЦРП $\geq$ 10 mg/L) [24]. Значајно повећан ризик за коронарну болест срца код носилаца ГА генотипа у кинеској популацији потврдила је студија коју су спровели Гу и сарадници [25]. Добијени резултати овог истраживања су показали да је присуство АГ генотипа код жена старијих од 60 година повезано са сниженом вредности ФВЦ у односу на млађе од 60 година. Како је оксидативни стрес присутан у многим болестима везаним за процес старења, захваљујући репарационој способности МСР систем испољава значајну улогу у успоравања прогресије болести [26]. Значај МСР система у заштити од оксидативних оштећења код болести везаних за старење, потврђен је у више студија. Канторов и сарадници [27] су доказали да МСРА у очном сочиву штити ћелије и њене компоненте од оксидације метионина, док "утишавање" овог гена повећава осетљивост на оштећења услед оксидативног стреса. Такође, показано је да повећана оксидације метионина до метионин сулфооксида у молекулу алфа-синуклеина у мозгу спречава његову фибрилацију, код Паркинсонове болести [28].

Према резултатима ове докторске дисертације независни предиктори за појаву ХОБП су снижена вредност СИА-еластазе, повишен ниво оксидованог ААТ, дефицијентни фенотипови ААТ и старост већа од 60 година. Поред тога у докторској дисертацији и пушење је, очекивано, потврђено као независан предиктор за појаву ХОБП. Смањена функционална активност ААТ (СИА-еластаза) и повећан оксидовани ААТ доведени су у везу са ХОБП у ранијим студијама [29, 30]. У појединим студијама старост већа од 60 година се доводи се у везу са већом учесталошћу ХОБП [31, 32, 33].

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] D. A. Lomas, D. L. Evans, J. T. Finch and R. W. Carrell, "The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver.," *Nature*, vol. 357, no. 6379, pp. 605-7, June 1992.
- [2] C. Larsson, "Natural history and life expectancy in severe alpha1-antitrypsin deficiency, Pi Z.," *Acta medica Scandinavica*, vol. 204, no. 5, pp. 345-51, 1978.
- [3] E. Piitulainen and S. Eriksson, "Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ).," *The European respiratory journal*, vol. 13, no. 2, pp. 247-51, February 1999.
- [4] G. Perincek and S. Avci, "Evaluation of alpha-1-antitrypsin levels in blood serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease.," *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, vol. 90, no. 1, pp. 37-43, October 2018.

- [5] Z. Sun and P. Yang, "Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression.," *The Lancet. Oncology*, vol. 5, no. 3, pp. 182-90, March 2004.
- [6] N. Takei, M. Suzuki, H. Makita, S. Konno, K. Shimizu, H. Kimura, H. Kimura and M. Nishimura, "Serum Alpha-1 Antitrypsin Levels and the Clinical Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 14, pp. 2885-2893, 2019.
- [7] A. R. Koczulla, S. Noeske, C. Herr, J. Koepke, R. A. Jörres, C. Nell, S. Schmid, C. Vogelmeier and R. Bals, "Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients.," *Respiratory medicine*, vol. 106, no. 1, pp. 120-6, January 2012.
- [8] H. Carp and A. Janoff, "Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants.," *The American review of respiratory disease*, vol. 118, no. 3, pp. 617-21, September 1978.
- [9] H. Carp, F. Miller, J. R. Hoidal and A. Janoff, "Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 79, no. 6, pp. 2041-5, March 1982.
- [10] D. M. Mannino, M. M. Reichert and K. J. Davis, "Lung function decline and outcomes in an adult population.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 173, no. 9, pp. 985-90, May 2006.
- [11] L. Watson, J. M. Vonk, C. G. Löfdahl, N. B. Pride, R. A. Pauwels, L. A. Laitinen, J. P. Schouten and D. S. Postma, "Predictors of lung function and its decline in mild to moderate COPD in association with gender: results from the Euroscop study.," *Respiratory medicine*, vol. 100, no. 4, pp. 746-53, April 2006.
- [12] P. J. Barnes, "Sex Differences in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Mechanisms.," in *American journal of respiratory and critical care medicine*, United States, 2016.
- [13] W. Q. Gan, S. F. P. Man, D. S. Postma, P. Camp and D. D. Sin, "Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis.," *Respiratory research*, vol. 7, no. 1, p. 52, March 2006.
- [14] A. Langhammer, R. Johnsen, A. Gulsvik, T. L. Holmen and L. Bjermer, "Sex differences in lung vulnerability to tobacco smoking.," *The European respiratory journal*, vol. 21, no. 6, pp. 1017-23, June 2003.
- [15] I.-C. Sørheim, A. Johannessen, A. Gulsvik, P. S. Bakke, E. K. Silverman and D. L. DeMeo, "Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men?," *Thorax*, vol. 65, no. 6, pp. 480-5, June 2010.
- [16] G. Ntritsos, J. Franek, L. Belbasis, M. A. Christou, G. Markozannes, P. Altman, R. Fogel, T. Sayre, E. E. Ntzani and E. Evangelou, "Gender-specific estimates of COPD prevalence: a systematic review and meta-analysis.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 13, pp. 1507-1514, 2018.
- [17] J. E. Wigginton, D. J. Cutler and G. R. Abecasis, "A note on exact tests of Hardy-Weinberg

equilibrium.," *American journal of human genetics*, vol. 76, no. 5, pp. 887-93, May 2005.

- [18] Z. Jelić-Ivanović, V. Spasojević-Kalimanovska, A. Topić, S. Spasić and V. Petrović, "alpha-1-Antitrypsin (Pi) polymorphism in Serbia: deviation of Pi M subtype distribution from the Hardy-Weinberg equilibrium.," *Gene geography : a computerized bulletin on human gene frequencies*, vol. 8, no. 2, pp. 129-35, August 1994.
- [19] A. Topic, M. Stankovic, A. Divac-Rankov, N. Petrovic-Stanojevic, M. Mitic-Milikic, L. Nagorni-Obradovic and D. Radojkovic, "Alpha-1-antitrypsin deficiency in Serbian adults with lung diseases.," *Genetic testing and molecular biomarkers*, vol. 16, no. 11, pp. 1282-6, November 2012.
- [20] M. Dahl, B. G. Nordestgaard, P. Lange, J. Vestbo and A. Tybjaerg-Hansen, "Molecular diagnosis of intermediate and severe alpha(1)-antitrypsin deficiency: MZ individuals with chronic obstructive pulmonary disease may have lower lung function than MM individuals.," *Clinical chemistry*, vol. 47, no. 1, pp. 56-62, January 2001.
- [21] SelfDecode, «Single Nucleotide Polymorphism Report,» 2018. [В Интернетe]. Available: <https://selfdecode.com/snp/rs10903323/>. [Дата обращения: 6 January 2021].
- [22] M. García-Bermúdez, R. López-Mejías, C. González-Juanatey, S. Castañeda, J. A. Miranda-Filloo, R. Blanco, B. Fernández-Gutiérrez, A. Balsa, I. González-Álvaro, C. Gómez-Vaquero, J. Llorca, J. Martín and M. A. González-Gay, "Association of the methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis.," *Scandinavian journal of rheumatology*, vol. 41, no. 5, pp. 350-3, October 2012.
- [23] J.-E. Martín, B. Z. Alizadeh, M. A. González-Gay, A. Balsa, D. Pascual-Salcedo, B. Fernández-Gutiérrez, E. Raya, L. Franke, R. van't Slot, M. J. H. Coenen, P. van Riel, T. R. D. J. Radstake, B. P. C. Koeleman and J. Martín, "Identification of the oxidative stress-related gene MSRA as a rheumatoid arthritis susceptibility locus by genome-wide pathway analysis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 62, no. 11, pp. 3183-90, November 2010.
- [24] Y. Zhang, H. Zhang, C. Zhuang, R. Liu and J. Wei, "MSRA polymorphism is associated with the risk of rheumatoid arthritis in a Chinese population.," *Scandinavian journal of rheumatology*, vol. 42, no. 2, pp. 91-6, 2013.
- [25] H. Gu, W. Chen, J. Yin, S. Chen, J. Zhang and J. Gong, "Methionine sulfoxide reductase A rs10903323 G/A polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population.," *Clinical biochemistry*, vol. 46, no. 16-17, pp. 1668-72, November 2013.
- [26] A. Hansel, S. H. Heinemann and T. Hoshi, "Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1703, no. 2, pp. 239-47, January 2005.
- [27] M. Kantorow, J. R. Hawse, T. L. Cowell, S. Benhamed, G. O. Pizarro, V. N. Reddy and J. F. Hejtmancik, "Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 26, pp. 9654-9, June 2004.
- [28] M. J. Hokenson, V. N. Uversky, J. Goers, G. Yamin, L. A. Munishkina and A. L. Fink, "Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein.," *Biochemistry*, vol.

43, no. 15, pp. 4621-33, April 2004.

- [29] F. Moraga and S. Janciauskiene, "Activation of primary human monocytes by the oxidized form of alpha1-antitrypsin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 11, pp. 7693-700, March 2000.
- [30] V. V. Damiano, A. Sandler, W. R. Abrams, D. R. Meranze, A. B. Cohen, P. Kimbel and G. Weinbaum, "Electron and light microscopic studies of the lungs of chloramine-T treated dogs.," *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, vol. 16 Suppl, pp. 141-56, 1980.
- [31] A. S. Buist, M. A. McBurnie, W. M. Vollmer, S. Gillespie, P. Burney, D. M. Mannino, A. M. B. Menezes, S. D. Sullivan, T. A. Lee, K. B. Weiss, R. L. Jensen, G. B. Marks, A. Gulsvik and E. Nizankowska-Mogilnicka, "International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study.," *Lancet (London, England)*, vol. 370, no. 9589, pp. 741-50, September 2007.
- [32] Y. Fukuchi, M. Nishimura, M. Ichinose, M. Adachi, A. Nagai, T. Kuriyama, K. Takahashi, K. Nishimura, S. Ishioka, H. Aizawa and C. Zaher, "COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study.," *Respirology (Carlton, Vic.)*, vol. 9, no. 4, pp. 458-65, November 2004.
- [33] Y. Yang, W. Li, Y. Guo, Y. Liu, Q. Li, K. Yang, S. Wang, N. Zeng, W. Duan, Z. Chen, H. Chen, X. Li, W. Zhao, R. Chen and Y. Kang, "Early COPD Risk Decision for Adults Aged From 40 to 79 Years Based on Lung Radiomics Features.," *Frontiers in medicine*, vol. 9, p. 845286, 2022.

## Г. ЗАКЉУЧАК - ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У овој докторској дисертацији кандидат Вера Р. Миловановић је анализирала повезаност алфа-1-антитрипсина и полиморфизма МСРА rs10903323 на настанак и развој ХОБП, као и квантитативне параметре ААТ. Анализом је уочено да пацијенти имају повишен ниво ААТ у односу на здраве испитанике. Добијене снижене вредности СИА-еластазе, СИА-трипсина и антитрипсинске активности могу да указују на ослабљену антипротеазну заштиту код пацијената са ХОБП.

Присуство инфламације, могло би бити узрок добијеног повећаног нивоа оксидације ААТ код пацијената у односу на здраве учеснике студије. Поред тога, ова студија је истакла пушење као значајан фактор утицаја на повећање нивоа оксидације ААТ, као и на опадања функционалне активности ААТ, што је доказано сниженим вредностима параметара функционалне активности ААТ (СИА-еластаза и СИА-трипсин), као и повишеним нивоом оксидованог алфа-1-антитрипсина код пацијената пушача.

Такође, овом студијом је након поделе пацијената према тежини болести на две групе, ГОЛД2 и ГОЛД3+4, истакнуто да са напредовањем ХОБП долази до опадања функционалне активности алфа-1-антитрипсина (СИА-еластаза, СИА-трипсин, антиеластазна и антитрипсинска активност) и раста нивоа оксидованог алфа-1-антитрипсина.

Ова студија потврђује да су дефицијентни фенотипови (МС, МЗ, СЗ) значајно више заступљени код ХОБП-пацијената у односу на контролну групу. Такође, мутирани фенотипови ААТ (МФ, МС, МЗ, СЗ) су значајно више заступљени код пацијената са ХОБП него код здравих испитаника. Очекивано, параметри функционалне активности алфа-1-антитрипсина (СИА-еластаза, СИА-трипсин и антитрипсинска активност) код носилаца недефицијентних фенотипа значајно су нижи код пацијената у односу на здраве, док је ниво оксидованог ААТ био значајно виши. Дефицијентни фенотипови алфа-1-антитрипсина (МС, МЗ, СЗ) представљају ризик за појаву ХОБП због снижене антитрипсинске активности.

Испитивање генетичке варијанте МСРА rs10903323 и утврђивање учесталости генотипова и алела МСРА rs10903323 у здравој популацији Србије и код ХОБП-пацијената по први пут је урађено у приказаној докторској дисертацији.

Према резултатима овог истраживања, значајно повећање оксидованог ААТ (%) код пацијената пушача са АГ МСРА rs10903323 генотипом у односу на пацијенте пушаче са АА генотипом и пораст оксидованог ААТ (g/L) код пацијента пушача са АГ генотипом у односу

на пацијенте непушаче са АГ генотипом указује на удруженост Г алела МСРА генотипа са пушењем, које доприноси смањеној антиоксидантној заштити алфа-1-антитрипсина. Поред тога, према докторској дисертацији присуство МСРА rs10903323 полиморфизма није довело до промене у функционалној активности алфа-1-антитрипсина у контролној групи и код ХОБП-пацијената.

Полиморфизам МСРА rs10903323 не утиче на функционалну активност ААТ и ниво оксидованог ААТ код ХОБП-пацијената у односу на тежину болести (ГОЛД2, ГОЛД 3+4). Значајан генетички фактор ризика који доприноси опадању плућне функције у млађој старосној доби, независно од пушачког статуса и пола, био је МСРА хомозигот АА.

Резултати овог истраживања указују да би одређивање МСРА rs10903323 полиморфизма, могло да помогне идентификацији особа са повећаним ризиком за појаву ХОБП. На овај начин идентификоване осетљиве особе, могле би благовремено да буду саветоване да се не излажу дуванском диму, било као активни или пасивни пушачи, а исто тако да се не излажу аеро загађењу и другим штетним факторима из спољне средине, у циљу превенције болести плућа.

Резултати ове студије имају клинички значај јер је ова студија показала да серумски биомаркери који су релативно јефтини и једноставни за одређивање, СИА-еластаза и оксидовани ААТ, уз фенотипизацију ААТ могу да унапреде постављење дијагнозе, праћење и превенцију ХОБП у клиничкој пракси. Такође, оксидовани ААТ би могао бити предложен као прогностички биомаркер за процену штетности пушења на појаву и тежину ХОБП, као и користан биомаркер за праћење деловања антиоксидативне терапије.

#### Д. ОБЈАВЉЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Topic A, **Milovanovic V**, Lazic Z, Ivosevic A, Radojkovic D. Oxidized Alpha-1-Antitrypsin as a Potential Biomarker Associated with Onset and Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Adult Population. COPD. 2018;15(5):472-478. DOI: 10.1080/15412555.2018.1541448

**Назив часописа:** Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / COPD

**Категорија:** Respiratory System (37/67)

**Импакт фактор (2018) = 2.503; M22**

2. **Milovanovic V**, Topic A, Milinkovic N, Lazic Z, Ivosevic A, Radojkovic D, Divac Rankov A. Association of the Methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with functional activity and oxidative modification of alpha-1-antitrypsin in COPD patients. Pulmonology 2024 Mar-Apr;30(2):122-129. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2021.09.003.

**Назив часописа:** Pulmonology

**Категорија:** Respiratory System (5/66)

**Импакт фактор (2022) = 11.7; M21a**



## **Ђ. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду бр. 204/2018) докторска дисертација „Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије”, аутора Вере Р. Миловановић, је послата на проверу оригиналности применом софтвера iThenticate. Поступак оцењивања докторске дисертације се наставља у смислу писања извештаја Комисије за оцену завршене докторске дисертације, стављања на увид јавности и доношењу одлуке о усвајању извештаја Комисије на Наставно-научном већу Универзитета у Београду–Фармацеутском факултету, док ће оцена извештаја о оригиналности бити накнадно достављена, односно представљаће обавезан саставни део материјала неопходног за давање сагласности одговарајућег Већа научних области медицинских наука и доношења одлуке о усвајању извештаја Комисије и именовању Комисије за одбрану докторске дисертације.

19.04.2024. године

Ментори

---

Проф. др Александра Топић,  
Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

---

Др сц. Александра Дивац, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду-Институт за молекуларну  
генетику и генетичко инжењерство

## Е. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу изложеног, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата дипл. фармацеута-медицинског биохемичара Вере Р. Миловановић чија је израда одобрена на седници Већа научних области медицинских наука Универзитет у Београду (Одлука бр. 61206-2771/2-22 од 13.07.2022. године), задовољава критеријуме оригиналног научног дела. Кандидаткиња је успешно реализовала постављене циљеве истраживања, а резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају оригинално и самостално научно дело са значајним научним доприносом у области медицинске биохемије. Резултати ове докторске дисертације публиковани су у два рада у међународним часописима (M22, M21a).

Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује докторску дисертацију дипл.фармацеута-медицинског биохемичара Вере Р. Миловановић под називом **„Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије“**, и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду–Фармацеутског факултета да прихвати овај извештај о завршеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, \_\_\_\_\_

Чланови комисије:

---

Др сц. Снежана Јовичић, доцент,  
Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

---

Др сц. Неда Милинковић, доцент,  
Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

---

Др сц. Зорица Лазич, редовни професор у пензији,  
Универзитет у Крагујевцу-Медицински факултет

---

Др сц. Мила Љујић, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду-Институт за молекуларну  
генетику и генетичко инжењерство