

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, broj 5940/4, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Povezanost bronhoskopske, kliničke i radiografske dijagnostike kod obolelih od sarkoidoze“

kandidata mr dr Spasoja Popevića, zaposlenog u Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije na radnom mestu šefa Kabineta za interventne pulmološke postupke Odeljenja bronhoskopije i invazivne dijagnostike i kliničkog asistenta na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Mentor je prof. dr Dragana Jovanović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Violeta Mihailović-Vučinić, redovni profesor katedre Interne medicine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, vanredni profesor katedre Interne medicine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragan Mandarić, redovni profesor katedre Hirurgije (Grudna hirurgija) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (u penziji)

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Spasoja Popevića napisana je na 89 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 14 slika, 13 tabela i 29 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i priloge.

U **uvodu** su jasno definisani problem savremene dijagnostike sarkoidoze, koja je bolest multisistemskog tipa, nepoznate etiologije, čija je osnovna karakteristika formiranje nekazeifikujućih granuloma u različitim tkivima i organima. Posle osvrta na epidemiologiju i patogenezu bolesti, kandidat detaljno opisuje simptomatologiju i dijagnostička ispitivanja u sarkoidozu, sa posebnim akcentom na biomarkere i invazivnu dijagnostiku (bronhoskopiju). Opisana je uloga endoskopskog nalaza, pojedinih tehnika biopsije, uključujući i najnoviju (endobronhijalni ultrazvuk-EBUS tj EBUS vodjenu transbronhijalnu iglenu aspiracionu biopsiju uvećanih limfnih nodusa u medijastinumu) koja se od 2013.godine sa velikim uspehom primenjuje u Klinici za pulmologiju. Na kraju uvoda, posebno su navedeni razlozi za sprovođenje ispitivanja koje je tema doktorske disertacije.

Cilj rada je precizno definisan. Cilj ispitivanja je bio utvrditi povezanost kliničkih, radiografskih i bronhoskopskih nalaza kod obolelih od sarkoidoze, u cilju procene kliničkog toka i aktivnosti bolesti.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je opservacijsko (deskriptivno) kliničko istraživanje (studija preseka) sprovedeno u Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije.

Prospektivnom analizom je obuhvaćen uzorak od 571 bolesnika sa bronhoskopski i histološki verifikovanom sarkoidozom, u različitim stadijumima plućne sarkoidoze i različitim kliničkim manifestacijama bolesti, u periodu od 2012-2015. godine. Kod bolesnika uključenih u istraživanje uzeta je detaljna anamneza i obavljen klinički pregled a potom učinjene laboratorijske analize u smislu detektovanja biomarkera sistemske sarkoidoze od značaja za procenu njene aktivnosti: aktivnost angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE) u serumu i aktivnost hitotriozidaze u serumu. Kod svih bolesnika učinjena

je radiografija grudnog koša i bronhoskopija sa biopsijom a kod odabrane grupe bolesnika sa hroničnom sarkoidozom u cilju procene aktivnosti bolesti i pozitronska emisiona tomografija/kompjuterizovana tomografija (PET/CT) grudnog koša. Za svakog bolesnika popunjen je upitnik koji sadržao sledeće delove: demografske karakteristike ispitanika istoriju bolesti: klinički, radiografski, bronhoskopski i laboratorijski nalaz. U cilju procene kliničkih simptoma bolesti formiran je sopstveni simptom skor koji je obuhvatao sledeće simptome sarkoidoze : kašalj, bol u grudima, otežano disanje, bol u kostima, otece zglobova, probleme sa kožom, glavobolju, diplopije, ispade kranijalnih nerava, osećaj zamora, i probleme sa snom. Svaki pojedinačni simptom skorovan je sa jednim bodom, tako da je maksimalni simptom skor iznosio 11. Svi upitnici su šifrirani, podaci o obeležjima kodirani, napravljena baza podataka (u MS Excel programu) i izvršena kompjuterska obrada odgovarajućim statističkim tehnikama. Analiza i obrada podataka sastojala se iz dva dela.

Prvi deo bila je deskripcija svih bolesnika.

U drugom delu je posmatrana statistička povezanost pojedinih varijabli: laboratorijskih, kliničkih, radiografskih i endoskopskih karakteristika sarkoidoze.

Statistička značajnost varijabli (simptoma, radiografskog i endoskopskog nalaza) je procenjena je χ^2 testom.

Pošto aktivnosti serumske hitotriozidaze i ACE nisu pratile normalnu distribuciju (što je testirano Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovima normalne raspodele) u statističkoj analizi ovih podataka su korišćeni neparametrijski testovi (Kruskal-Wallis i Spearman-ova korelacija) a rezultati prikazani kao medijane sa interkvartilnim intervalima (IQR).

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 117 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da od sarkoidoze skoro dvostruko češće oboljevaju žene (66,1%) nego muškarci (33,9%) i da je ta razlika statistički visoko značajna ($\chi^2=58,7$, $p<0.001$). Kod većine bolesnika sa plućnom sarkoidozom (preko 70%) dominantni simptomi i znaci su bili: suv i uporan kašalj, promene na koži, zamaranje, bol u grudima, otežano disanje, kao i otoci zglobova. Skoro 80% bolesnika bilo je u prvom radiografskom stadijumu bolesti a najmanje ih je bilo u trećem i četvrtom stadijumu. Analizom laboratorijskih parametara aktivnosti sarkoidoze, kod muškaraca je registrovana statistički značajno veća aktivnost i ACE i hitotriozidaze. Nije bilo statistički značajne povezanosti sa dobnom grupom bolesnika. Nadjena je visoko statistički značajna razlika u aktivnosti hitotriozidaze u serumu između bolesnika sa aktivnom i neaktivnom sarkoidozom. Aktivnost ACE u serumu je isto tako statistički značajno različita kod bolesnika sa aktivnom bolešću u odnosu na grupu sa neaktivnom sarkoidozom.

Najveća aktivnost hitotriozidaze je detektovana kod bolesnika u drugom radiografskom stadijumu bolesti.

Analiza ROC („Receiver-operating-characteristic curve) u predviđanju aktivnosti sarkoidoze pokazala je da je nivo serumske hitotriozidaze od 100 nmol/mL/h pokazao osetljivost od 82,5% i specifičnost od 70,0%.

Većina bolesnika je imala patološki bronhoskopski nalaz, nezavisno od radiografskog stadijuma bolesti a uočena je visoko statistički značajna povezanost endoskopskog nalaza i radiografskog stadijuma bolesti ($p\leq 0.005$). Od biopsionih tehnika, najveća pozitivnost nalaza zabeležena je kod primene transbronhijalne iglene aspiracione biopsije.

Metoda koja je dala najveći dijagnostički doprinos kod nalaza limfnih nodusa u medijastinumu manjih od 20mm je ultrazvučno vodjena transbronhijalna iglena aspiraciona biopsija.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ovom radu kroz detaljnu analizu kliničkih, radiografskih i bronhoskopskih nalaza 571 bolesnika sa patohistološki dokazanom sarkoidozom, ukazano je na značajnu povezanost svih navedenih aspekata od značaja za dijagnostiku sarkoidoze.

Kao multisistemska, multiorganska bolest sarkoidoza može imati čitav niz svojih kliničkih prezentacija, kojoj su sa druge strane pridodati varijeteti radiografskog nalaza i kao i različiti aspekti bronhološkog nalaza.

U preko 90% bolesnika sarkoidoza zahvata pluća i /ili limfne žlezde medijastinuma pa je to upravo razlog zašto se uglavnom dijagnostikuje i leči od strane pulmologa.

Do definitivne dijagnoze sarkoidoze često je veoma dug put. Ovi bolesnici se često pogrešno dijagnostikuju kao bolesnici sa drugim plućnim oboljenjima (kao na primer bronhijalna astma i hronična opstruktivska bolest pluća).

Kašalj je veoma čest i problematičan simptom kod sarkoidoze. Tačan mehanizam nastanka kašlja nije poznat. U studiji *Tully-ja i Birring-a* iz 2015.godine bronhijalna hiperreaktivnost i inflamacija disajnih puteva su među glavnim potencijalnim uzrocima kašlja što je u skladu s rezultatima ove studije gde je kod 81,8% bolesnika endoskopski nadjena hiperemija sluznice. Još jedno objašnjenje za prisustvo hroničnog kašlja jeste povišen nivo serumske aktivnosti ACE kod bolesnika. *Sinha i sar.* pronašli su jaku vezu između ACE i osetljivosti refleksa kašlja u studiji iz 2011.godine.

Sindrom hroničnog zamora imalo je 81% bolesnika u ovom istraživanju. Brojni autori, među kojima i *Drent i sar.* u istraživanju objavljenom 2012. godine ovaj sindrom objašnjavaju postojanjem inflamacije i poliartralgijama.

U ovom radu korišćena su dva aktuelna biomarkera sarkoidozne aktivnosti (ACE i hitotriozidaza) i korelirana je njihova značajnost u odnosu na kliničke forme bolesti, akutnu ili hroničnu, kao i u odnosu na aktivnu odnosno inaktivnu sarkoidozu.

Grupa autora sa Univerziteta u Sijeni (*Bargagli i sar.*) je uočila značajno veću aktivnost hitotriozidaze u serumu kod obolelih od sarkoidoze u poređenju s kontrolnom grupom; viša aktivnost hitotriozidaze je takođe zabeležena kod aktivne sarkoidoze u poređenju sa bolesnicima sa neaktivnom bolešću. Postoji značajna povezanost radiografskog stadijuma plućne sarkoidoze i radiografskih CT karakteristika bolesti, što se poklapa sa rezultatima

ove studije gde je nađena značajna povezanost između aktivnosti hitotriozidaze i stadijuma plućne bolesti, dok za ACE nije nađena veza. Opšte je prihvaćeno da radiografski nalaz odražava i prognozu bolesti, pa ova povezanost implicira da hitotriozidaza ima prognostički značaj. Slično su potvrdili u svojim studijama i drugi autori (*Grosso i sar. Bargagli i sar. 2008. i 2013. i Golab i sar.*). U ovoj studiji, vrednosti hitotriozidaze u serumu bile su najveće kod bolesnika u drugom stadijumu bolesti, što se razlikuje od druge slične studije *Bargagli-ja i sar.* koji su najvišu aktivnost hitotriozidaze našli u trećem stadijumu bolesti. Uočena diskrepanca samo doprinosi dilemi: da li je hitotriozidaza enzim koji indukuje hiperekspresiju profibrotičnih citokina tipa 2 (Th2)-što je u skladu sa III radiografskim stadijumom plućne bolesti-ili je pokazatelj aktivnosti „svežih“ granuloma, koji se mogu naći u II stadijumu sarkoidoze?

Najvažnija razlika između dva biomarkera (hitotriozidaze i ACE) je nađena u odnosu na aktivnost sarkoidoze. Ova studija je pokazala visoku senzitivnost -82.5% za aktivnost hitotriozidaze u serumu od samu 100/nmol/mL/h u potvrdi aktivne sarkoidoze i specifičnost od 70% u isključivanju aktivnosti sarkoidoze. Nivo ACE u serumu imao je znatno nižu senzitivnost (66%) i specifičnost (54%) u odnosu na aktivnost bolesti. Do sličnih zaključaka došli su Bargagli i sar: kod 232 bolesnika sa sarkoidozom ROC analiza je pokazala senzitivnost od 88.6% i specifičnost od 92.8%

Bronhološko ispitivanje prvi je korak u definitivnoj dijagnostici plućnih lezija. Metode koje su u svakodnevnoj praksi kod nas i u svetu koriste jesu :

- 1) Transbronhijalna biopsija pluća (*TBB-Transbronchial (lung) biopsy*)
- 2) Endobronhijalna biopsija (*EBB-Endobronchial biopsy*)
- 3) Transbronhijalna iglena biopsija (*cTBNA/TBNA-Transbronchial needle aspiration biopsy*)

TBB je prihvaćena kao standard za dijagnostiku svih bolesnika sa suspektom sarkoidozom bez obzira na radiografski stadijum i aktivnost bolesti .

U studiji turskih autora (*Celikoglua i sar.*) kod bolesnika u prvom stadijumu dokazano je postojanje sarkoidnih granuloma u visokom procentu (55% prema 70% u drugom i trećem stadijumu).

Na našem materijalu transbronhijalna biopsija je mnogo češće pozitivna nego negativna u uznapredovalim stadijumima sarkoidoze i taj procenat iznosi čak 89% za III stadijum plućne sarkoidoze. ($p=0.018$). Procenat naših pozitivnih nalaza u prvom stadijumu je 10%, što je dosta manje u odnosu na nalaze iz literature, ali se uklapa u nalaze *Navanija i saradnika* koji imaju 12% pozitivnih nalaza u I stadijumu bolesti.

Endobronhijalna biopsija povećava efikasnost TBB za 10% udružena sa ovom metodom (78-86%) u studiji *Gupta i sar.*

U mnogo slučajeva respiratorna mukoza može izgledati potpuno normalno ali EBB može biti dijagnostički metod i u ovim slučajevima. Nekoliko studija (korišćena rigidna bronhoskopija-*Benedicta i sar.*, *Bybee-a i sar.*, i *Friedman-a i sar.*) prikazalo je pozitivne EBB u 24% do 44% bolesnika što se uklapa u nalaze naše analizirane grupe.

U studiji *Moralesa i sar.* dijagnostička efikasnost TBNA u prvom i drugom stadijumu sarkoidoze bila je 50%, uz značajno povećanje efikasnosti kada je bila udružena sa TBB (10% do 20%), što je potpuno u saglasju s rezultatima ovog istraživanja.

Dijagnostički doprinos od 100% ultrazvučno vodjene TBNA na relativno malom broju bolesnika u ovoj studiji (svega 29) je potpuno u skladu sa drugim, sličnim istraživanjima, a posebno komparativnom analizom *Goyal i sar.* iz 2014. godine.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Spasoje Popević, Zorica Šumarac, Dragana Jovanović, Dragan Babić, Mihailo Stjepanović, Snežana Jovičić, Dragana Šobić-Šaranović, Snežana Filipović, Branko Gvozdenović, Maja Omčikus, Anđela Milovanović, Jelica Videnović-Ivanov, Ana Radović, Vladimir Žugić, Violeta Mihailović-Vučinić. Verifying sarcoidosis activity: chitotriosidase versus ace in sarcoidosis—a case-control study. *Journal of Medical Biochemistry* Br. DOI: 10.1515/jomb-2016-0017
Rad je primljen za štampu 08.04 2016.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Povezanost bronhoskopske, kliničke i radiografske dijagnostike kod obolelih od sarkoidoze**“ dr Spasoja Popevića predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju karakteristika i specifičnosti dijagnostike sarkoidoze. Analiza podataka ukazuje da u našoj populaciji najčešće oboljevaju žene, srednjeg životnog doba, uglavnom sa akutnom kliničkom slikom sarkoidoze u I radiografskom stadijumu bolesti.

Aktivnost bolesti, ispitivana biomarkerima serumskim ACE i serumskom hitotriozidazom, ukazala je na serumsku hitotriozidazu kao značajno pouzdaniji biomarker, visoke specifičnosti i senzitivnosti.

Serumska hitotriozidaza bila je u značajnoj korelaciji sa kliničkom procenom aktivne bolesti, radiografskim stadijumom bolesti i nalazom PET/CT koji je ukazivao na aktivnost bolesti.

Bronhološka dijagnostika u signifikantnom procentu (86,5%) pokazala je neki od modaliteta patološkog nalaza a najčešći endoskopski nalaz bila je hiperemija bronhijalne sluzokože (81,8%).

Pokazana je značajna povezanost bronhoskopskog nalaza i radiološkog stadijuma bolesti. Najveći procenat pozitivnih nalaza od bronholoških metoda dala je TBNA.

EBUS dijagnostika dala je pozitivne rezultate kod svih bolesnika kod kojih je učinjena, mada je njihov broj iz tehničkih razloga bio veoma mali – svega 29.

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 Spasoja Popevića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 30.06.2016.godine

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Violeta Mihailović-Vučinić

Prof. dr Dragana Jovanović

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović

Prof. dr Dragan Mandarić
