

Факултет Фармацеутски

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

01 број
(Број захтева)Већу научних области медицинских наука
(Назив већа научне области коме се захтев упућује)20.06.2024.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуке о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и о именовању комисије за одбрану

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

КАНДИДАТ МИЛОВАНОВИЋ (РАДОСАВ) ВЕРА
(име, име једног од родитеља и презиме)студент докторских студија на студијском програму Фармацеутске науке
пријавио је докторску дисертацију под називом:**„Значај алфа 1 антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије“**из научне области: МЕДИЦИНСКА БИОХЕМИЈАУниверзитет је дана 13.07.2022.године својим актом под бр. 02-01 број 61206-2771/2-22 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:**„Значај алфа 1 антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије“**Име и презиме ментора : - Проф др. Александра Топић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет;
- Др сци. Александра Дивац - Ранков, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерствоКомисија за оцену докторске дисертације именована је на седници одржаној 07.03.2024.године одлуком факултета под бр. 01 бр.521/2, у саставу:Име и презиме члана
комисије

звање

научна област

Установа у којој
је запослен

1. Др сци. Снежана Јовичић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет, председник Комисије
2. Др сци. Неда Милинковић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
3. Др сци. Зорица Лазић, редовни професор у пензији, Универзитет у Крагујевцу - Медицински факултет (у пензији од 01.10.2022.године)
4. Др сци. Мила Љујић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Датум стављања извештаја Комисије и докторске дисертације на увид јавности: 16.05.2024.године.

Наставно-научно веће факултета усвојило је извештај Комисије за оцену докторске дисертације наследници одржаној дана 20.06.2024.године.

Комисија за одбрану докторске дисертације именована је на седници одржаној 07.03.2024.године

одлуком факултета под бр. 01 број 521/2, у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1. Др сци. Снежана Јовичић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет, председник Комисије			
2. Др сци. Неда Милинковић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет			
3. Др сци. Зорица Лазић, редовни професор у пензији, Универзитет у Крагујевцу - Медицински факултет (у пензији од 01.10.2022.године)			
4. Др сци. Мила Љујић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство			

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

- Прилози:
1. Одлука Наставно-научног већа о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и одлука о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације
 2. Извештај Комисије о оцени докторске дисертације
 3. Примедбе на извештај Комисије о оцени докторске дисертације (уколико их је било) и мишљење Комисије о примедбама

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
11000 - БЕОГРАД
Ул. Војводе Степе 450.
01. број _____
20.06.2024. године

На основу члана 28. Статута и предлога Комисије за последипломске студије, Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета на седници одржаној 20.06.2024. године, донело је

О Д Л У К У

ПРИХВАТА СЕ позитиван извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата дипл. фарм. – мед. биохем. Вере Миловановић под насловом: „Значај алфа 1 антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије“ и упућује Већу научних области медицинских наука на усвајање, а по добијеној писаној сагласности одобрава јавна одбрана пред Комисијом у саставу:

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

Универзитет је дана 13.07.2022.године својим актом бр.: 02-01 бр: 61206-2771/2-22 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

Кандидат дипл. фарм. мед. биохем. Вера Миловановић, објавила је резултате из ове докторске дисертације у једном раду категорије M21a и једном раду категорије M22 у међународним часописима са СЦИ листе:

1. **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.
IF (2022) = 11,7; Respiratory System (5/66) M21a
2. 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
IF (2018) = 2,503; Respiratory System (37/67) M22

Одлуку доставити: именованој, Универзитету, члановима комисије, декану, секретару, продекану за последипломске студије, менторима (Проф др. Александра Топић и др. Александра Дивац-Ранков), Одсеку за наставу и студентска питања, Одсеку за правне и опште послове, пословном секретару и архиви.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ФАРМАЦЕУТСКОГ
ФАКУЛТЕТА**

Проф. др Слађана Шобајић

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 анализирних 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 узорак 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 узорак 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 (% $\cdot$ 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-сулфоксида 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 3 алела од 3,6% и С алела од 1,9%; у контролној групи, учесталост 3 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 3 алел од 1,3% и С алел 0,7%. У дисертацији нису детектовани пацијенти носиоци 3 хомозиготног фенотипа, за разлику од студије Топић и сарадника [19], спроведене у популацији Србије где је добијена учесталост 3 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 варијенте, 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 обухваћених 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

rs10903323 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 сулфоксида 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 ДОКТОРСKE 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-елаза, 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-елазе 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-елазе, 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-елазе, 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 Универзитета 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 Лазић, 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

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије**“, аутора Вере Р. Миловановић, констатујемо да утврђено подударање текста износи 20%. Овај степен подударности последица је коришћења речи који се односе на: називе испитиваних биомаркера, називе и поступке аналитичких метода, називе и појмове статистичких метода, медицинске појмове, опште појмове и податаке, као и претходно публиковане резултате добијене у овој докторској дисертацији, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

23.04.2024. године

Ментори

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

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



ORIGINAL ARTICLE

Association of the methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with functional activity and oxidative modification of alpha-1-antitrypsin in COPD patients



V. Milovanovic^{a,*}, A. Topic^a, N. Milinkovic^a, Z. Lazic^b, A. Ivosevic^b, D. Radojkovic^c, A. Divac Rankov^c

^a University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Department of Medical Biochemistry, Belgrade, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia

^c Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Received 20 June 2021; accepted 19 September 2021

Available online 18 October 2021

KEYWORDS

MSRA;
Polymorphism;
Chronic obstructive
pulmonary disease;
Oxidatively modified
alpha-1-antitrypsin;
Specific inhibitor
activity to elastase

Abstract

Objective: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is multi-factorial disorder which results from environmental influences and genetic factors. We aimed to investigate whether methionine sulfoxide reductase A (MSRA) rs10903323 gene polymorphism is associated with COPD development and severity in Serbian adult population.

Methods: The study included 155 patients with COPD and 134 healthy volunteers. Genotyping was determined performing home-made polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The difference between the inhibitory activities of normal and oxidized Alpha-1-Antitrypsin (A1AT) against elastase and trypsin was used for determination of Oxidized Alpha-1-Antitrypsin (OxyA1AT) (expressed as % and g/L). Functional activity of A1AT was presented as a specific inhibitor activity to elastase (SIA-Elastase, kU/g).

Results: Frequencies of the genotypes AA, AG and GG were 80.0%, 20.0%, 0% in COPD patients and 80.5%, 18.5% and 1.5% in the control group, and there was no significant difference in genotype or allele distributions between groups. Serum level of A1AT (g/L) and OxyA1AT was significantly higher in COPD patients than in the control group, but functional activity of A1AT (SIA-Elastase) was significantly lower in COPD patients than in the control group. In COPD group, increased level of OxyA1AT was present in G allele carriers who were smokers relative to G allele carriers who were not smokers. In the smoker group of patients with severe and very severe COPD (GOLD3+4), significant increase in OxyA1AT level was present in G allele carriers compared to AA homozygotes.

Conclusion: These findings suggest that MSRA rs10903323 gene polymorphism is probably not a risk for COPD by itself but could represent a COPD modifier, since minor, G allele, is associated

* Corresponding author at: Vojvode Stepe, 450, 11221 Belgrade, Serbia.

E-mail address: milovanovic.vera.mrph@gmail.com (V. Milovanovic).

with an increased level of oxidized A1AT, indicating impaired ability of MSRA to repair oxidized A1AT in COPD-smokers, and in severe form of COPD.

© 2021 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow limitation that is not fully reversible, which usually progresses, together with an abnormal inflammatory response to noxious particles or gases.¹ Genetic predisposition involved in pathogenesis of COPD is the focus of numerous studies. Nowadays, it is clear that the development and progression of this complex disease depends of the multiple genetic and environmental factors. Many studies confirmed that smoking contributes 15% to the variability of lung function and that COPD ultimately develops in 10 to 15% of smokers,² whilst genetic factors account for more than 40%.³

Alpha-1-antitrypsin (A1AT) is the archetype member of the large protein family of SERPINs (Serine Proteinase Inhibitors), and the major circulating inhibitor of many proteases. It is well known that primary function of A1AT is essential for lung parenchyma, where it protects the alveolar matrix from destruction by neutrophil elastase (NE).⁴ A1AT inhibits NE at its active site which contains Methionine 358 and 351 which is located in a highly stressed external loop protruding from the molecule.⁵ Since the methionine residues are vulnerable to oxidation and especially due to its position in A1AT molecule, methionine is easily oxidized which results in forming methionine-sulfoxide, disabling normal antiprotease function of A1AT.⁶ Beside the hereditary A1AT deficiency, due to mutations in A1AT gene, decreased activity of A1AT due to oxidation of Met^{3,5,8} by endogenous and exogenous prooxidants, leads to functional deficiency of A1AT with normal serum levels. During inflammatory processes in COPD, many proinflammatory cells, such as neutrophils and macrophages, become activated and liberate reactive oxygen and nitrogen species which may contribute to increased oxidative stress and attack the active centre of A1AT.⁷ Exogenous sources of oxidants like cigarette smoke and environmental pollution have very important roles in A1AT oxidation.⁸ It has been documented that methionine-oxidized A1AT isolated from rats was partially restored with addition of Methionine sulfoxide reductase A (MSRA) from the cytosol of human neutrophils *in vitro*.⁹ Also, it was shown that MSRA originated from *Escherichia coli* has the ability to reduce the A1AT which was oxidized by the chloramine-T.¹⁰ These suggest that MSRA enzyme activity may be involved in reparation of the damage to proteins that have undergone oxidation, and restoration of their physiological function. MSRA is specific for the reduction of free and protein-based methionine-S-sulfoxide and is the only known enzyme capable of reducing methionine-S-sulfoxide to methionine.¹¹ MSRA was first identified in *Escherichia coli*, and was later discovered in a large number of organisms with greater level of expression in the kidney and liver than in the heart, lung, brain, skeletal muscle, retina, testis, bone marrow and blood.^{12,13} In mammals, this enzyme is

mainly present in the mitochondrial matrix, but was also found in cytosol and in the nucleus.¹⁴

Methionine sulfoxide reductase A (EC 1.8.4.11) is composed of 235 amino acids and is encoded by a 375 kb long gene located on chromosome 8p23.1.¹⁵ Data from the literature suggested that the dysfunction of methionine sulfoxide reductases is involved in the pathogenesis of human diseases, such as brain diseases,¹⁶ age-associated diseases,¹⁷ and vitiligo.¹⁸

Since it was revealed that oxidized A1AT can be restored by MSRA, and that the COPD is associated with functional deficiency due to the oxidation of active centre of A1AT, a possible disease modifier could be MSRA gene polymorphism. SNP rs10903323 (A/G) is located in MSRA gene in intron 3. It is assumed that this gene polymorphism may affect the protection of A1AT from prooxidants and influence on its anti-elastase activity. Hence, the question is whether reference A allele or alternative (minor) G allele is associated with higher risk of COPD.

We aimed to explore the association of MSRA rs10903323 gene polymorphism and functional activity of A1AT, as well as the levels of oxidized A1AT with the risk for COPD development and disease severity. Additional goal of this study was to investigate MSRA rs10903323 gene polymorphism for the first-time in the adult population of Serbia, as well as in COPD pathology.

Material and methods

This study included 155 patients with COPD with a mean age of 64 years, who were recruited from the Clinical for Pulmonary Disease, Clinical Centre of Kragujevac, Republic of Serbia. In the patient group, 64 were declared as current smokers and 67 as current non-smokers. Diagnosis of COPD disease was determined using anamnesis, spirometry tests and physical examination.

Spirometry tests for pulmonary function assessment encompassed measuring FVC (forced vital capacity, % predicted value), FEV1 (forced expiratory volume in 1 second, % of predicted value) and FEV1/FVC ratio. The severity of COPD was defined according to Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD) criterion (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases). Disease severity data according to the GOLD classification were available for 95 patients. Patients with A1AT concentrations below the lower limit of the range (1.1 g/L), indicating a possible congenital A1AT deficiency, were excluded from the study. The control group included 134 healthy volunteers with a mean age of 43 years who were recruited from Health Centre, Belgrade, Serbia. During medical examination it was confirmed that their results of laboratory parameters are in the normal range. All control subjects were without history

of pulmonary disease and did not show symptoms of lung disorders currently. The control group consisted of 49 smokers and 83 non-smokers.

Venous blood was sampled from each participant in two tubes, one without anticoagulant and the other coated with EDTA. All of the blood samples and isolated sera were stored at -80°C until analysis.

All participants gave written consent and completed a questionnaire about age and smoking status. The study protocol was approved by the local Ethic Committee (CCK 11/09/14. No.01/9600) and confirms the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki.

Methods

PCR-RFLP

A whole blood sample was used for PCR test. The pairs of primers that were used in assay were, For: 5'-GAATAAATAAATGGTGCTGGCCACACAG-3', and Rev: 5'-CCAGTCCCTAGATGG

AATCCCATG-3' (Thermo Fisher Scientific). PCR mixture was containing 1 µL whole blood sample, 1 pmol of each primer, 1xbuffer with 0.15 mM Mg (Fast Gene), 2 mM dNTP (KAPA Biosystem) and 1 U Taq DNA polymerase (Fast Gene). The PCR conditions were 97°C for 3 min, 55°C for 2 min in 3 cycle, and 30 cycles: 94°C for 30", 56°C for 30", 72°C for 30" with final elongation at 72°C for 5 min.

Restriction digestion reaction mixture contained 10 µL of amplified sample, restriction enzyme 1 U Adel (Dralll) (500 U, Thermo Scientific), 1x Buffer G (with BSA) (Thermo Scientific). After incubation over night at 37°C, digestion products were analysed by electrophoresis on 3 % agarose gel. The distribution of bands was as follows: 190 bp for the uncut product (A allele), and 165 and 25 bp long for cut product (G allele).

Serum level, functional activity and oxidative modification of alpha-1-antitrypsin

Assay for Elastase Inhibitory Capacity (EIC) of alpha-1-antitrypsin

Elastase inhibitor capacity of alpha-1-antitrypsin was determined by modified methods by Bieth et al.¹⁹ and optimized for automatic analyser (Beckman Coulter, Olympus AU400). Stock elastase was prepared by dissolving elastase (Elastase from porcine pancreas min.200 U/mg, SERVA) in a buffer 0.05M TRIS/0.05 NaCl, pH 8.0. Stock substrate was prepared dissolving N-succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Alanyl-p-nitroanilide (STAPNA, SERVA) in 100% dimethyl-sulfoxide (DMSO). 3 µL of diluted stock elastase (1:5) by buffer and 297 µL of buffer were added to serum sample (1:5) and control analyses (40 mg/L albumin). The mixture was incubated for 4 minutes at 37°C. Immediately after incubation, 25 µL of substrate STAPNA was added to mixture and was reacted with excess of elastase, which was not inhibited by A1AT from serum sample. The change of absorbance due to elastase activity was measured at 410 nm per minute during 5 minutes. EIC in serum sample was calculated using the

equitation: $EIC (kU/L \text{ or } mM/L/min) = (\Delta A/min_{control} - \Delta A/min_{serum}) \times f$; $f = (1/8.8mM) \times (337/12) \times 5 = 15.956$, where 8.8 mM is molar absorptivity of p-nitroaniline at 410 nm, 337/12 is dilution factor of serum (337 µL is total mixture volume and 12 µL is sample volume) and the factor 5 is initial serum dilution factor.

Assay for Trypsin Inhibitory Capacity (TIC) of alpha-1-antitrypsin

Trypsin inhibitory capacity of alpha-1-antitrypsin was assayed by modified methods by Schwert and Takenaka²⁰ and optimized for automatic analyser (Beckman Coulter, Olympus AU400). As substrate for determining trypsin activity was used N-α-benzoyl-dL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA, SIGMA) which was prepared by dissolving in DMSO. 20 µL of bovine trypsin (Trypsin from bovine pancreas ca. ≥10.000 BAEE units/mg protein, SIGMA) previously dissolved in 0.001 M HCl and 280 µL of 0.05M Tris-HCl buffer (pH 8.0) were added to serum sample (1:5) and control analyses (40 g/L albumin). 25 µL of substrate was added after an incubation period of 4 minutes at 37°C, after which started the lag phase lasting for 1 minute. Then the change in absorbance was measured for 5 minutes per minute at wavelength 410 nm. TIC in serum sample was calculated using the equation: $TIC (kU/L \text{ or } mM/L/min) = (\Delta A/min_{control} - \Delta A/min_{serum}) \times f$; $f = (1/8.8mM) \times (329/4)$, where 8.8 is molar absorbance of p-nitroaniline at 410 nm, 329/4 is dilution factor of serum and the factor 5 is initial serum dilution factor.

The serum level of A1AT (g/L) was determined by immunoturbidimetric method using Siemens ADVIA^R Chemistry Analyzer and Alpha-1-antitrypsin Reagent. Specific inhibitory activity of A1AT towards elastase (SIA-Elastase) were calculated using equations: $SIA-Elastase (kU/g) = EIC(kU/L) / A1AT(g/L)$. Level of oxidized A1AT (OxyA1AT, %) was calculated using equation $OxyA1AT (\%) = [1 - (1.27/TIC_{sample}/EIC_{sample}) \times 100]$, where the value 1.27 represents the $TIC_{reduced}/EIC_{reduced}$ ratio of the fully reduced A1AT by mercaptoethanol, while the value $TIC_{sample}/EIC_{sample}$ in serum sample represents the oxidized ratio.²¹ Calculation of Oxy-A1AT (g/L) was done using equation: $OxyA1AT (g/L) = [Oxy-A1AT (\%) \times A1AT (g/L)] / 100$.

Statistical analysis

The one-sample Kolmogorov-Smirnov test was used to estimate normality of the distribution of variables. Differences between genotypes and allele frequencies of methionine sulfoxide reductase A rs10903323 polymorphism were evaluated using χ^2 -test. Deviations of genotypes distributions from Hardy-Weinberg equilibrium were assessed by χ^2 -test for each cohort or Fisher's exact test (if cases <5). Student t-test for independent samples was used for comparison of continuous variables. Three-way ANOVA and Sidak post hoc test were used to analyse differences in continuous variables according to genotype, smoking status, and disease development or severity. The p value <0.05 was regarded as statistically significant. Statistical analysis was done using SPSS 20.0 software.

Table 1. Demographic data, clinical characteristics, parameters of functional activity and oxidative modification of A1AT in COPD-patient and control groups.

Characteristic	COPD n=155	Controls n=134
Age (years)	64.51±8.29 ^a	43.50±11.02
BMI (kg/m ²)	24.60±5.51 ^a	26.93±3.93
Smokers (%)	47.4	38.8
A1AT (g/L)	2.13±0.51 ^a	1.70±0.30
SIA-Elastase (kU/g)	0.27±0.09 ^a	0.33±0.06
OxyA1AT (%)	19.61±8.59 ^a	17.58±6.06
OxyA1AT (g/L)	0.41±0.19 ^a	0.31±0.12
FEV1 % predicted	37.22±18.11	-
FVC % predicted	56.94±22.71	-
FEV1/FVC (%)	51.09±13.27	-
GOLD 2 (%)	22.1	-
GOLD 3+4 (%)	77.9	-

Values for the quantitative variables are presented as the mean ± standard deviation; smoking status, FEV1/FVC ratio and COPD stage are presented as percentages; FEV1 and FVC are expressed as % of predicted value^a p value <0.05.

Abbreviations: A1AT, alpha-1-antitrypsin; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; BMI, body mass index; SIA-elastase, specific inhibitory activity of A1AT towards elastase; OxyA1AT, oxidized alpha-1-antitrypsin; FEV1(%), forced expiratory volume in 1 s; FVC (%), forced vital capacity; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

Results

The demographic data, clinical characteristics, functional activity and oxidative modification of A1AT in all study participants are presented in Table 1. Kolmogorov-Smirnov test showed normal distribution of quantitative variables ($p > 0.05$). COPD patients were significantly older and had a lower body mass index (BMI) than healthy subjects ($p < 0.001$, $p = 0.007$ respectively). Serum level of A1AT (g/L) and OxyA1AT (expressed as % of total A1AT and g/L) was significantly higher in COPD patients than in the control group ($p < 0.001$, $p = 0.033$, $p < 0.001$, respectively). However, activity of A1AT, measured by SIA-Elastase, was

significantly lower in COPD patients than in the control group ($p < 0.001$).

Observed frequencies of genotypes and alleles of MSRA rs10903323 in COPD patient and the control group are presented in Table 2. Frequencies of MSRA genotypes in both populations were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium (COPD group: $\chi^2=1.91$, $p = 0.380$; control group: $\chi^2=0.25$, $p = 0.880$). A significant difference in genotype distribution between COPD patients and controls ($p = 0.289$) was not found in this study. Frequencies of the genotypes AA, AG and GG were 80.0 %, 20.0 %, 0 % in COPD patients and 80.5 %, 18.5 % and 1.5 % in the control group. Also, there was no significant difference between COPD and the control group when the frequencies of MSRA rs10903323 minor allele carriers (AG and GG genotype) were compared to homozygote AA carriers ($p = 0.889$).

A three-way ANOVA test was conducted to explore the influence of MSRA rs10903323 gene polymorphism, presence of disease and smoking status on functional activity of A1AT and OxyA1AT in COPD patient and the control group (Fig. 1.). The combined influence between MSRA rs10903323 gene polymorphism, smoking status and presence/absence of COPD on the OxyA1AT (%) was not statistically significant, $F(1,209) = 0.803$, $p = 0.371$. SIA-Elastase was significantly lower in patient-smokers than in control-smokers in both AA homozygotes ($p < 0.001$), and in G allele carriers ($p = 0.027$) (Fig. 1 a.).

Using the Sidak post hoc test revealed that COPD-smokers who are G allele carriers of MSRA rs10903323 had significantly higher OxyA1AT (%) than AA homozygotes ($p = 0.028$, partial eta squared=0.023) (Fig. 1 c.). In group of smokers, levels of OxyA1AT (%) and Oxy A1AT (g/L) were significantly increased in patients relative to controls in AA homozygous ($p = 0.001$, $p < 0.001$ respectively), as well as in G allele carriers ($p = 0.008$, $p = 0.002$ respectively) (Fig. 1.. c., d.). In the control group, AA homozygous non-smokers showed significantly higher level of OxyA1AT (%) than smokers ($p = 0.043$) (Fig. 1 c.). In the COPD group, increased level of Oxy A1AT (both expressed as % and g/L) was present in G alleles carriers who were smokers relative to G alleles carriers who were non-smokers, with probability close to the level of significance ($p = 0.056$, $p = 0.056$ respectively) (Fig. 1 c., d.).

Table 2. Frequencies of genotypes and alleles of MSRA rs10903323 in COPD-patient group and in control groups.

MSRA rs10903323	COPD-patients (n=155) n (%)	Control (n=134) n (%)	P*
Genotype			
AA	124 (80.0)	108 (80.5)	0.887
AG	31 (20.0)	24 (18.0)	0.654
GG	0	2 (1.5)	0.214
AG+GG	31 (20.0)	26 (19.5)	0.887
Allele			
A	279 (90.0)	240 (89.5)	0.862
G	31 (10.0)	28 (10.5)	0.862
H-W, χ^2 (P**)	1.91 (0.380)	0.25 (0.880)	

Abbreviations: MSRA, methionine sulfoxide reductase A; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; H-W, Hardy-Weinberg equilibrium.

* Difference in genotype/allele frequency between COPD-patient and control groups

** testing Hardy-Weinberg equilibrium.

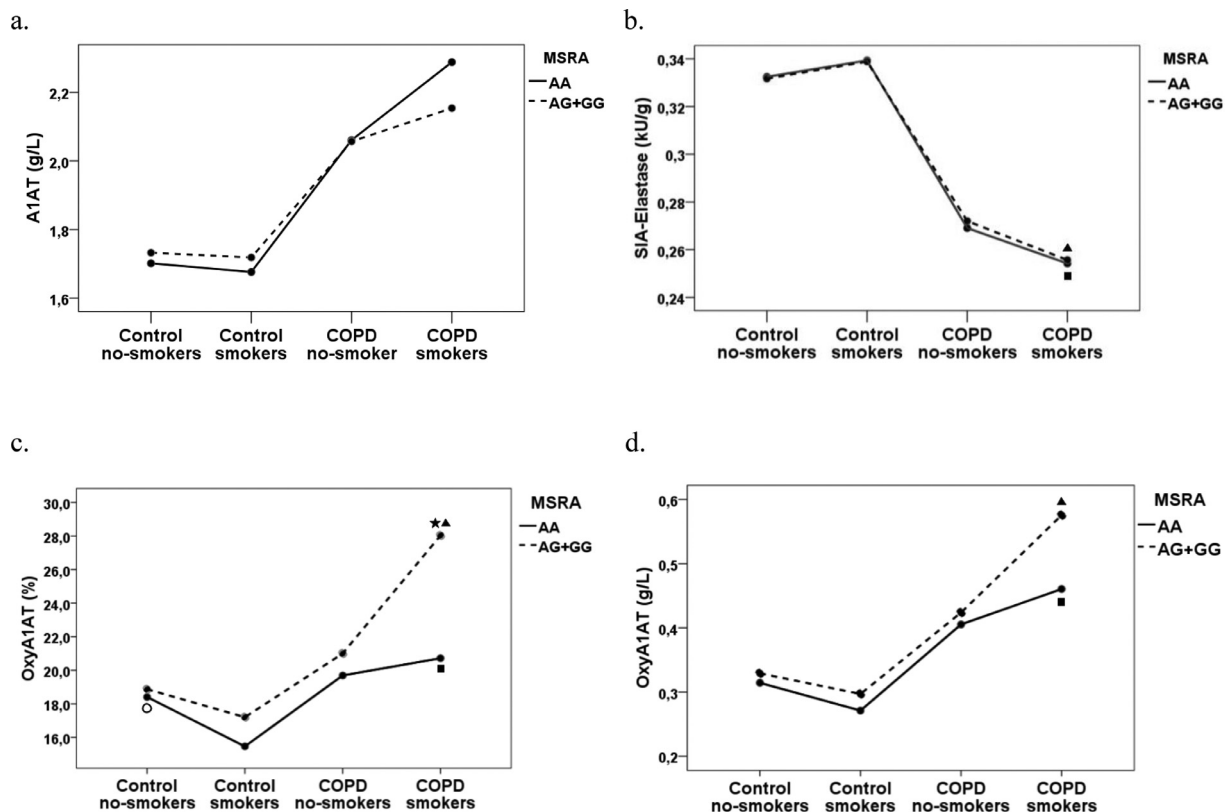


Fig. 1 The influence of MSRA rs10903323 gene polymorphism on parameters of functional activity of A1AT and level of oxidized A1AT in COPD patients and the control group classified according to smoking status as smokers and non-smokers: a. concentration of A1AT; b. SIA-Elastase (kU/g); c. OxyA1T (%) and d. OxyA1AT (g/L) (Tested by Sidac post hoc test); $\square$ difference in AA homozygous patients-smokers in relation to control-smokers; $\blacktriangle$ difference in G allele carriers patients-smokers in relation to control-smokers; $\star$ difference in G allele carriers patients-smokers in relation to AA homozygous patients-smokers; $\circ$ difference in controls non-smokers in relation to control-smokers

Abbreviations: A1AT, alpha-1-antitrypsin; MSRA, Methionine sulfoxide reductase A; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; OxyA1AT, oxidized alpha-1-antitrypsine; SIA-elastase, specific inhibitory activity of A1AT towards elastase.

A three-way ANOVA test was conducted to explore the influence of MSRA rs10903323 polymorphism, COPD severity and smoking status on functional activity of A1AT and OxyA1AT in COPD patient group (Fig. 2.). The combined influence of MSRA rs10903323 polymorphism, disease severity and smoking status on the all of three investigated parameters was not found (for SIA-Elastase ($F(3.76) = 0.471$, $p = 0.703$; for OxyA1AT (%) ($F(3.76) = 0.997$, $p = 0.399$; for OxyA1AT (g/L) ($F(3.76) = 0.714$, $p = 0.547$)). The difference in the functional activity of the A1AT relative to the MSRA rs10903323 genotype can be seen only in the moderate stage of disease (GOLD2 group) where SIA-Elastase was lower in G allele carriers than in AA homozygotes (Fig. 2 a.), but without statistical significance. Using the Sidak post hoc test revealed tendency for smokers with severe and very severe COPD (GOLD3+4) who are G allele carriers of MSRA rs10903323 to have higher OxyA1AT (%) than AA homozygotes ($p = 0.086$) (Fig. 2 b.). Patients with severe and very severe disease who were smokers and carriers of G allele, had significantly increased levels of OxyA1AT (%), compared to AA homozygotes (using independent sample t-test, $p < 0.001$, $p = 0.041$, respectively).

Discussion

We have investigated the association of MSRA rs10903323 gene polymorphism with COPD pathology, with emphasis on its impact on A1AT activity. The association between MSRA and COPD may be explained by the fact that MSRA can partially repair the oxidized methionine in active centre of A1AT, and restore its anti-elastase function. The association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the MSRA gene with human diseases has not been intensively investigated in worldwide populations. According to available data, this is the first study which investigated the MSRA rs10903323 gene polymorphism in the Serbian population. To the best of our knowledge, MSRA rs10903323 gene polymorphism was investigated for the first time in COPD pathology. The results obtained for our population (AA 80 %, AG 18.5 % and GG 1.5 %) are in concordance with available data for European general population (AA 78.3 %, AG 20.5 % and GG 1.2 %),²³ regarding both genotype and allele distribution. Distribution of MSRA rs10903323 genotypes varies significantly between different populations. For example, frequencies of AA, AG and GG genotypes in population of East

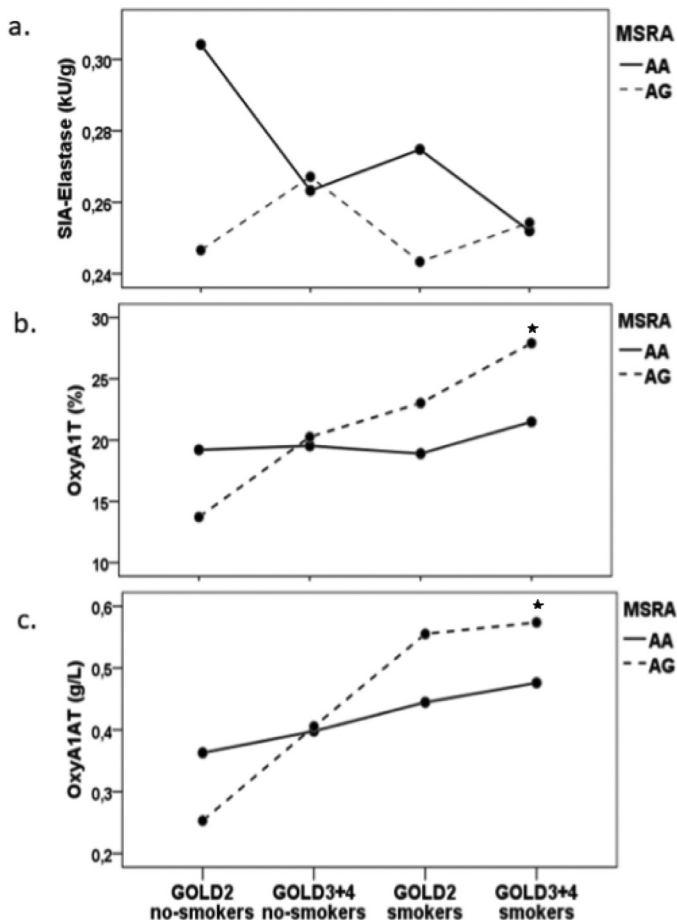


Fig. 2 The influence of MSRA rs10903323 gene polymorphism on parameters of functional activity of A1AT and level of oxidized A1AT in COPD patients classified in two groups according to disease severity (GOLD2 and GOLD 3+4) and smoking status (smokers and non-smokers): a. SIA-Elastase (kU/g); b. OxyA1AT (%) and c. OxyA1AT (g/L); ★ difference in smokers patients (GOLD3+4) G allele carriers in relation to AA homozygous. Abbreviations: MSRA, Methionine sulfoxide reductase A; Oxy-A1AT, oxidized alpha-1-antitrypsin; SIA-elastase, specific inhibitory activity of A1AT towards elastase; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

Asia are 15.1 %, 49.2 %, 35.7 %, and in population of America are 50.7 %, 32.0 %, 17.3 %.²³ We did not find any difference in distribution of MSRA rs10903323 genotypes (AA, AG and GG) and alleles between COPD patients and the control group, indicating that this polymorphism does not present a risk factor for development of COPD, but can rather act as a modifier of disease progression or severity. Also, there was no difference in frequency for genotype AA and genotype AG +GG between the two investigated groups.

Considering that COPD is an inflammatory disease of the airways, mainly associated with cigarette smoke exposure, our result of elevated A1AT concentrations in patients compared to healthy subjects was expected because A1AT is a positive acute phase protein. High concentration of A1AT is a physiological response to an excessive liberation of NE by neutrophils, which protects an organism from the uncontrolled proteolysis of host tissues.²⁴ We have found that

COPD patients had a higher level of OxyA1AT (expressed as % and g/L) than the control group. This result indicates that higher A1AT concentration in patients with COPD is not associated with the better anti-elastase activity because an elevated level of oxidative modified A1AT causes the decrease of its functional activity. This assumption is further strengthened by the fact that we have found reduced A1AT effective anti-elastase activity in patients compared to healthy participants, through the decreased SIA-Elastase (Table 1.).

Cigarette smoking (CS) has traditionally been considered a major risk factor for developing COPD, due to the harmful effect of numerous prooxidants on the lung function. Many studies investigated gene expression in relation to smoking behaviour. Gene expression levels may be up-regulated or down-regulated as a consequence of smoking and also may be associated with the number of cigarettes per day.²⁵ There is limited data about the influence of CS on MSRA expression. One study showed an increase in MSRA expression after CS exposure in HaCaT cells.²⁶ The main result of our study was identification of elevated OxyA1AT (%) in patient-smokers group of G allele carriers in relation to patient-smokers with AA genotype (Fig. 1c.). Additionally, among the G allele carriers, COPD patients who were smokers had increased levels of OxyA1AT (% g/L) in relation to patients who were non-smokers (Fig. 1c., d.). This suggests that the presence of G allele in current smokers may contribute to an increased risk for COPD, at least regarding the OxyA1AT level which is thought to participate in the pathogenesis of the disease.²⁷ These results indicate the importance of smoking cessation, in patients with diagnosed disease, and especially in carriers of the of MSRA rs10903323 G allele. An increased level in OxyA1AT level was also observed in the group of smokers who were AG heterozygotes, and who had a more severe form of the disease (GOLD 3+4) compared to patients with the same disease severity, but who were AA homozygotes (Fig. 2 b., c.). This study revealed a potential modifier gene that leads to inadequate A1AT repair in smokers, resulting in an increase in oxidative modified A1AT. This modifier is a MSRA rs10903323 G allele and it is associated with a higher risk of a more severe form of COPD. This polymorphism was shown to be connected with several disorders characterized by chronic inflammation and increased oxidative stress, similar to COPD (rheumatoid arthritis (RA), coronary artery disease). Two studies found association of this polymorphism with RA.^{28,29} In genome-wide pathway analysis Martín et al concluded that MSRA rs10903323 gene polymorphism was related to increased oxidative stress and pathogenesis of RA in a Spanish population.²⁸ Similar data was obtained in a Chinese population,²⁹ where MSRA rs10903323 GA genotype was associated with rheumatoid arthritis development, especially among older male patients, and CRP-positive patients. The MSRA rs10903323 minor allele G was additionally identified as the risk for development of ischaemic heart disease, observed in patients with RA, in Spanish cohort.³⁰ Gu et al demonstrated that subjects with heterozygous GA genotype were at a significantly increased risk for coronary artery disease in the Chinese population.³¹

Considering that COPD, rheumatoid arthritis and cardiovascular diseases share common causes which involve inflammation, we can suggest that the presence of the MSRA rs10903323 G allele is a risk for COPD due to the reduced antioxidant functions of MSRA. In COPD pathology we

showed specificity that G allele is associated with increased oxidative modified A1AT, of which the main physiological function is protection of lower respiratory tract. In this context, the determination of oxidized A1AT, which is relatively simple and inexpensive, may be useful for identification of particularly vulnerable individuals with COPD, namely smokers and carriers of MSRA rs10903323 G allele. Also, the potential clinical significance of the MSRA rs10903323 polymorphism could be for patients with hereditary A1AT deficiency which is associated with decreased plasma level of this antiprotease. In these patients, detection of the MSRA rs10903323 G allele, in addition to hereditary A1AT deficiency, could be considered an additional risk for developing lung diseases (such as emphysema). For this group of susceptible patients, strict preventative measures against the exposure to tobacco smoke or other air pollutants and pro-oxidants would have to be carried out throughout their lifetime.

There were several limitations to our study. As the groups tested were relatively small, these findings need to be confirmed by additional studies with a larger sample size, preferably in different populations. There are several more polymorphisms in MSRA gene and some of them could also be important for enzyme activity regarding restoration of A1AT function. The information about their presence would help to identify the full extent to which MSRA affects COPD phenotype. It would also be beneficial to directly measure the expression and/or the activity of MSRA gene/enzyme in participant samples, in order to confirm that the presence of the analysed variants has a direct impact on MSRA ability to perform its antioxidizing function effectively. This data is not available in the current literature.

Conclusions

Our study is the first one analysing the association of MSRA rs10903323 gene polymorphism with the risk of development and severity of COPD. The assumption is that MSRA G allele is associated with decreased ability of MSRA to reduce oxidized A1AT in patient-smokers, resulting in an impaired antioxidant protection against prooxidants from tobacco smoke. Our results might be useful to clarify the contribution of MSRA rs10903323 gene polymorphism in individual predisposition to COPD and its role in disease pathogenesis.

Funding

This research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia through Grant Agreement with University of Belgrade-Faculty of Pharmacy No: 451-03-9/2021-14/200161 and Grant Agreement with IMGGE, University of Belgrade No. 451-03-9/2021-14/200042.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgment

Authors would like to thank Mr. Andrew Carruthers (Toronto, Canada) for the proofreading and editing.

References

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2020 GOLD Report. Available at https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1.2-03Dec19_WMV.pdf [Accessed 2 November 2020].
2. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationship between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115(2):195–205. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.115.2.195>.
3. Coultas DB, Hanis CL, Howard CA, Skipper BJ, Samet JM. Heritability of ventilatory function in smoking and nonsmoking New Mexico Hispanics. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(4):770–5. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.4.770>.
4. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest.* 1963;15(2):132–40. <https://doi.org/10.1080/00365516309051324>.
5. Hunington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* 2000;407(6806):923–6. <https://doi.org/10.1038/35038119>.
6. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27258–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004850200>.
7. Van Eeden SF, Sin DD. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a lung and systemic process. *Can Respir J.* 2013;20(1):27–9. <https://doi.org/10.1155/2013/509130>.
8. Feldman C, Anderson R. Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems. *J Infect.* 2013;67(3):169–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.05.004>.
9. Glaser CB, Karic L, Parmelee S, Premachandra BR, Hinkston D, Abrams WR. Studies on the turnover of methionine oxidized alpha-1-protease inhibitor in rats. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136(4):857–61. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/136.4.857>.
10. Abrams WR, Weinbaum G, Weissbach L, Weissbach H, Brot N. Enzymatic reduction of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor restores biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7483–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7483>.
11. Lee BC, Dikiy A, Kim HY, Gladyshev VN. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(11):1471–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.014>.
12. Kuschel L, Hansel A, Schönherr R, et al. Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS Lett.* 1999;456(1):17–21. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00917-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00917-5).
13. Moskovitz J, Jenkins NA, Gilbert DJ, et al. Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(8):3205–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3205>.
14. Kim HY, Gladyshev VN. Role of structural and functional elements of mouse methionine-S-sulfoxide reductase in its subcellular distribution. *Biochemistry.* 2005;44(22):8059–67. <https://doi.org/10.1021/bi0501131>.
15. Starr JM, Shiels PG, Harris SE, et al. Oxidative stress, telomere length and biomarkers of physical aging in a cohort aged 79 years

- from the 1932 Scottish Mental Survey. *Mech Ageing Dev.* 2008 (12):745–51. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.09.020>.
16. Reiterer M, Schmidt-Kastner R, Milton SL. Methionine sulfoxide reductase (Msr) dysfunction in human brain disease. *Free Radic Res.* 2019;53(11-12):1144–54. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1662899>.
 17. Oien DB, Moskovitz J. Genetic regulation of longevity and age-associated diseases through the methionine sulfoxide reductase system. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(7):1756–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.016>.
 18. Schallreuter KU, Rübsem K, Gibbons NC, et al. Methionine sulfoxide reductases A and B are deactivated by hydrogen peroxide (H₂O₂) in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2008;128(4):808–15. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701100>.
 19. Bieth J, Spiess B, Wermuth CG. The synthesis and analytical use of highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med.* 1974;11(4):350–7. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(74\)90134-3](https://doi.org/10.1016/0006-2944(74)90134-3).
 20. Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta.* 1995;16(4):570–5. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(55\)90280-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90280-8).
 21. Beatty K, Robertie P, Senior RM, Travis J. Determination of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor in serum. *J Lab Clin Med.* 1982;100(2):186–92.
 22. Weinbaum G, Weissbach L, Weissbach H, Brot N. Enzymatic reduction of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor restores biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7483–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7483>.
 23. Health Report Service. Single Nucleotide Polymorphism Report. Available at <https://selfdecode.com/snp/rs10903323/#>. [Accessed 6 January 2021].
 24. Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.* 2004;5(3):182–90. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01414-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01414-7).
 25. Vink JM, Jansen R, Brooks A, et al. Differential gene expression patterns between smokers and non-smokers: cause or consequence? *Addict Biol.* 2017;22(2):550–60. <https://doi.org/10.1111/adb.12322>.
 26. Sticozzi C, Cervellati F, Muresan XM, Cervellati C, Valacchi G. Resveratrol prevents cigarette smoke-induced keratinocytes damage. *Food Funct.* 2014;5(9):2348–56. <https://doi.org/10.1039/c4fo00407>.
 27. 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):472–8. <https://doi.org/10.1080/15412555.2018.1541448>.
 28. Martin JE, Alizadeh BZ, González-Gay MA, et al. Identification of the oxidative stress-related gene MSRA as a rheumatoid arthritis susceptibility locus by genome-wide pathway analysis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3183–90. <https://doi.org/10.1002/art.27648>.
 29. Zhang Y, Zhang H, Zhuang C, Liu R, Wei J. MSRA polymorphism is associated with the risk of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Scand J Rheumatol.* 2013;42(2):91–6. <https://doi.org/10.3109/03009742.2012.730626>.
 30. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, et al. Association of the methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2012;41(5):350–3. <https://doi.org/10.3109/03009742.2012.677063>.
 31. Gu H, Chen W, Yin J, Chen S, Zhang J, Gong J. Methionine sulfoxide reductase A rs10903323 G/A polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Clin Biochem.* 2013;46(16-17):1668–72. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.07.011>.



Oxidized Alpha-1-Antitrypsin as a Potential Biomarker Associated with Onset and Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Adult Population

A. Topic, V. Milovanovic, Z. Lazic, A. Ivosevic & D. Radojkovic

To cite this article: A. Topic, V. Milovanovic, Z. Lazic, A. Ivosevic & D. Radojkovic (2018) Oxidized Alpha-1-Antitrypsin as a Potential Biomarker Associated with Onset and Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Adult Population, COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 15:5, 472-478, DOI: [10.1080/15412555.2018.1541448](https://doi.org/10.1080/15412555.2018.1541448)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15412555.2018.1541448>



Published online: 13 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 842



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 4 View citing articles [↗](#)



Oxidized Alpha-1-Antitrypsin as a Potential Biomarker Associated with Onset and Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Adult Population

A. Topic^a, V. Milovanovic^a, Z. Lazic^b, A. Ivosevic^b, and D. Radojkovic^c

^aDepartment of Medical Biochemistry, University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia; ^bFaculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^cInstitute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

ABSTRACT

Oxidative stress could reduce inhibitor activity of the alpha-1-antitrypsin (A1AT). Oxidative-modified A1AT (oxidized alpha-1-antitrypsin, OxyA1AT) significantly loses ability to protect the lungs from neutrophil elastase. We aimed to investigate OxyA1AT as a potential biomarker associated with onset and severity of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in adult population. The study included 65 patients with COPD (33 smokers and 32 no-smokers) and 46 healthy participants (17 smokers and 29 no-smokers). Determination of OxyA1AT in serum was based on the difference between the inhibitory activities of normal and oxidized A1AT against trypsin and elastase. The level of OxyA1AT was significantly increased in the group of COPD smokers compared to healthy no-smokers ($p=0.030$) and COPD no-smokers ($p=0.009$). The highest level of OxyA1AT was found in group of smokers with severe and very severe COPD in comparison to the following: no-smokers with the same stage of disease ($p=0.038$), smokers with moderate COPD ($p=0.022$), and the healthy control group, regardless of the smoking status (control no-smokers $p=0.001$ and control smokers $p=0.034$). In conclusion, serum level of OxyA1AT would be potentially good biomarker for the assessment of harmful effect of smoking to the onset and severity of COPD. Also, clinical significance of OxyA1AT as prognostic biomarker could be useful in assessing the effectiveness of antioxidant therapy for COPD and emphysema. Suitable and inexpensive laboratory method for determination of OxyA1AT is additional benefit for the introduction of OxyA1AT into routine clinical practice for diagnosis and monitoring of COPD.

ARTICLE HISTORY

Received 28 June 2018
Accepted 23 October 2018

KEYWORDS

Chronic obstructive pulmonary disease; oxidized alpha-1-antitrypsin; specific inhibitor activity to elastase; specific inhibitor activity to trypsin

Introduction

World Health Organization report states that the main risk factors for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are tobacco smoke (including passive exposure), indoor air pollution (such as biomass fuel used for cooking and heating), outdoor air pollution, occupational dust, and exposure to chemicals (vapors, irritants, and fumes) (1). Tobacco smoke contains harmful toxins, which inhaled directly into the lungs over prolonged periods of time can lead to severe lung irritation, triggering the onset of COPD. The earliest pathological changes that include hyperplasia of the basal cells of airway epithelium induced by smoking are critical to the pathogenesis of COPD (2). At least three interrelated pathophysiological mechanisms affect the lung function due to the influence of tobacco smoke: inflammation, oxidative stress, and protease–antiprotease imbalance (3). Prolonged exposure to the tobacco smoke causes the recruitment of inflammatory cells to the lung, which presents a risk for tissue damage through the release of toxic mediators, including proteolytic enzymes and reactive oxygen species (4). The protease–antiprotease imbalance in the pathogenesis of COPD is closely related to tobacco smoke via oxidative stress and inflammatory response (5). Tobacco smoke

promotes inflammatory cells influx into lungs, which under certain conditions excessively releases a variety of proteases, including neutrophil elastase (NE), proteinase 3, matrix metalloproteinases, and cathepsins, which inhibited their endogenous inhibitors. Furthermore, pro-oxidants originating from tobacco smoke could promote oxidative modification and inactivate the protease inhibitors. Consequently, over-activated proteases could degrade components of the extracellular matrix, elastin fibers, and collagen, and therefore can destroy lung tissue.

Clinical studies indicated that imbalance between NE and their main circulating inhibitor alpha-1-antitrypsin (A1AT) causes the development of COPD and even panlobular emphysema with characteristic widespread destruction of alveolar tissue and dilation of small airspaces throughout the lungs (6).

A1AT is an acute-phase glycoprotein, mainly synthesized in hepatocytes and subsequently secreted into the plasma. A1AT is able to inhibit a variety of serine proteinases, but its major physiological role is to inhibit NE in lower respiratory tract, and protect pulmonary connective tissue from NE released from triggered neutrophils. Human NE (EC 3.4.21.20) stored in the primary (azurophil) granules of

polymorphonuclear neutrophils (PMNs) is able to degrade most of the components of the pulmonary extracellular matrix (ECM), including elastin, collagens, proteoglycans, and laminin (7).

The active sites of A1AT at residue Met³⁵⁸-Ser³⁵⁹, as well as at the residue Met³⁵¹ are susceptible to oxidation by several oxidants from tobacco smoke, and form stimulated inflammatory cells (8). Oxidation of both Met³⁵⁸ and Met³⁵¹ to methionine sulfoxide significantly reduces the ability of A1AT to inhibit NE (9).

Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency (A1ATD) is associated with retention of mutant A1AT polymers in hepatocytes which leads to decrease of circulating A1AT with less than 15% of normal level in A1ATD homozygotes. Since the integrity of lung alveoli is maintained by proper circulating level of A1AT, severe deficiency of this protein was identified as genetic risk factor for COPD and emphysema. Clinical manifestation of emphysema in patients with A1ATD occurs in 3rd decade in smokers, in the 5th decade in nonsmokers, and requires replacement therapy with purified A1AT pooled from plasma of blood donors (10). The cut-off level of A1AT which protects the lung tissue from proteases is 0.49 g/L (11 µM), and this value is therapeutic goal of the so-called "augmentation therapy" for patients with severe A1ATD. Many epidemiological studies investigated the significance of hereditary A1ATD on lung function decline, but much less attention is devoted to the study of non-inherited functional deficiency of A1AT. Acquired functional deficiency of A1AT, caused by pro-oxidants released from tobacco smoke or activated phagocytes, such as peroxide, hydroxyl radicals, hypochloride, chloramines, and peroxynitrite may reduce antiprotease activity of A1AT, although the level of A1AT in serum may stay normal (11).

Thitherto, it seems that utility of circulating level of A1AT as a biomarker of susceptibility to onset of COPD is limited due to the complex interrelationship among tobacco smoke exposure, circulating level of A1AT, lung function, and systemic inflammatory status.

Therefore, we aimed to investigate the utility of oxidized alpha-1-antitrypsin (OxyA1AT) as a potential diagnostic and prognostic biomarker associated with COPD onset and severity in adult population.

Materials and methods

Subjects and samples

This case-control study included 65 patients with COPD (42 males and 23 females), who were recruited from the Clinic for Pulmonary Diseases, Clinical Centre of Kragujevac, Serbia. Patients included in this study were hospitalized for COPD. Among the patients, 33 were current smokers, and 32 current no-smokers. Diagnosis of COPD and severity of disease was established based on medical history, physical examination, and pulmonary function tests (spirometry parameters: forced expiratory volume in 1 second, % of predicted value, FEV1%; forced vital capacity, % of predicted value, FVC%; and FEV1/FVC ratio). Severity of COPD was classified according to Global Initiative for

Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) classification (12): Moderate COPD (GOLD 2; $50\% \leq FEV1 < 80\%$ predicted), Severe COPD (GOLD 3; $30\% \leq FEV1 < 50\%$ predicted) and very severe COPD (GOLD4; $FEV1 < 30\%$ predicted). Exclusion criteria were mild and severe hereditary A1AT deficiency, and COPD-patients with less than 60% of normal serum level of A1AT (< 0.9 g/L) were not included in the study. The second exclusion criteria were the presence of other pulmonary diseases, such as bronchial asthma, bronchiectasis, tuberculosis, lung cancer, and other.

The control group included 46 healthy subjects (41 males and 5 females), with normal laboratory test results and normal pulmonary status assessed by physical examination, carried out in Health Centre, Belgrade, Serbia. In the control group, 29 subjects were current no-smokers, and 17 were current smokers.

Venous blood samples for laboratory testing were collected, and after centrifugation the sera were isolated and stored at -80°C until the start of the analysis.

Basic data about age and current smoking status (smokers or no-smokers) were collected through questionnaires completed by all participants. All participants in study provided written informed consent. The study was approved by the local Ethics Committee and was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Methods

Assay for trypsin inhibitory capacity

Trypsin inhibitory capacity (TIC) was determined using modified methods by Schwert and Takenaka (13). In brief, *N*- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) purchased from SERVA was used as a substrate for determining trypsin activity. Five microliters of porcine trypsin (Trypsin from porcine pancreas ca. 60 U/mg, SERVA), previously dissolved in 0.001 M HCl and 3.0 mL of Tris-HCl (pH 8.0) were added to the serum samples and to control analysis (40 g/L albumin). After incubation period of 10 minutes at 37°C , 20 µL BAEE was added, and the excess of trypsin activity which was not inhibited by A1AT from serum sample was measured. Trypsin activity was measured spectrophotometrically (UV-1800 Shimadzu UV/VIS spectrophotometer) as the change in absorbance at 253 nm per minute ($\Delta A/\text{min}$) for 5 minutes. TIC in serum samples were calculated by equation: $\text{TIC (kU or mM/L/min)} = (\Delta A/\text{min}_{\text{control}} - \Delta A/\text{min}_{\text{serum}}) \times f$; $f = (1/1.15 \text{ mM}) \times (3045/5) = 529$, where 1.15 mM is molar absorptivity of BAEE at 253 nm, and 3045/5 is dilution factor of serum samples.

Assay for elastase inhibitor capacity

Elastase inhibitory capacity (EIC) was assayed by modified methods by Bieth et al. (14). The method was optimized for automatic analyzer, Instrumentation Laboratory® ILab 650. The elastase activity was determined using substrate *N*-succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Alanyl-*p*-nitroanilide (STAPNA) purchased from SERVA. Stock elastase was prepared by dissolving elastase (Elastase from porcine pancreas min.

Table 1. Characteristics of investigated control group, all patients with COPD and patients divided into two groups according to COPD severity.

Characteristic	Control (n = 46)	COPD patients		
		All (n = 65)	GOLD 2 (n = 18)	GOLD 3 and 4 (n = 47)
Age, years	56 ± 5*	64 ± 9	65 ± 7	63 ± 10
Males, n (%)	41 (89)	42 (65)	11 (61)	31 (66)
Smokers, n (%)	17 (37)	33 (51)	7 (39)	26 (55)
A1AT, g/L	1.5 ± 0.34*	1.7 ± 0.40	1.6 ± 0.35	1.8 ± 0.41
FEV1%	–	39 ± 22	68 ± 14**	28 ± 13
FVC%	–	62 ± 25	89 ± 16**	51 ± 19
FEV1/FVC	–	48 ± 11	56 ± 9**	45 ± 11

Continuous data are presented as mean ± standard deviation.

*Difference from COPD patient group ($p < 0.05$).

**Differences from patients with COPD stage GOLD 3 and 4 ($p < 0.001$).

200 U/mg, SERVA) in a buffer 0.05 M TRIS/0.05 NaCl, pH 8.0. The three microliters of stock elastase and 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 were added to the diluted serum samples (1:5) and control analysis (40 g/L albumin), respectively. The mixture was incubated for 10 minutes at 37 °C. The assay started by adding of 12 microliters of STAPNA that hydrolyze the remaining elastase, which was not inhibited by A1AT from sample, and the increase in absorbance at 405 nm was monitored for 5 minutes. EIC in serum samples were calculated by equation: $\text{EIC (kU or mM/L/min)} = (\Delta A/\text{min}_{\text{control}} - \Delta A/\text{min}_{\text{serum}}) \times f$; $f = (1/9.9 \text{ mM}) \times (357/3) \times 5 = 60$, where 9.9 mM is the molar absorptivity of *p*-nitroaniline at 405 nm, 357/3 is dilution factor of serum, and the factor value 5 is initial serum dilution factor.

The serum level of A1AT (g/L) was determined by immunoturbidimetric method using Beckman Coulter AU480 analyzer and Randox reagent for A1AT RX series (Cat. No AA 2471). Specific inhibitory activity of A1AT toward trypsin (SIA-Trypsin) and elastase (SIA-Elastase) was calculated as a ratio between functional activity of A1AT (TIC or EIC) and immunoreactive level of A1AT (g/L).

Determination of oxidized A1AT

Determination of oxidized A1AT in serum is based on difference between the inhibitory activities of normal and oxidized A1AT against a trypsin-like enzyme and elastase, without influences of other proteins in serum (15). The functionally active A1AT inhibits both porcine trypsin and porcine pancreatic elastase, while oxidized A1AT lost its inhibitory activity toward porcine pancreatic elastase, and its net trypsin inhibitory capacity was partially preserved.

According to the proposed method, percent of oxidized A1AT (OxyAAT, %) was calculated by equation: $\text{OxyA1AT (\%)} = [1 - (1.27/(\text{TIC}_{\text{sample}}/\text{EIC}_{\text{sample}}))] \times 100$; the value of 1.27 in equation represents the $\text{TIC}_{\text{reduced}}/\text{EIC}_{\text{reduced}}$ ratio of the fully mercaptoethanol-reduced purified A1AT. Thus, the ratio of values $\text{TIC}_{\text{sample}}/\text{EIC}_{\text{sample}}$ in serum sample determines the oxidized ratio. Finally, for the certain concentration of A1AT (g/L), the level of OxyA1AT (g/L) was calculated by equation: $\text{OxyA1AT (g/L)} = [\text{OxyA1AT (\%)} \times \text{A1AT (g/L)}]/100$.

Statistical analysis

Normality of variables was assessed by the one-sample Kolmogorov–Smirnov test (K-S test). Student *t*-test for

independent samples, one-way analysis of variance (one-way ANOVA), and post hoc comparison (Least Significant Difference, LSD test) were used for comparison of continuous variables among the groups. The two-way ANOVA was used for comparison of differences in the level of OxyA1AT between patients according to the smoking status and severity of COPD. The linear relationship between functional activity of A1AT (SIA-Trypsin, SIA-Elastase) and OxyA1AT was evaluated using the Spearman's correlation analysis. Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 software. In this study, a *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Demographic and clinical characteristics of healthy participants and patients with COPD are presented in Table 1. Patients with diagnosed COPD were older than participants in control group. Also, COPD-patients had significantly higher serum level of A1AT than in control group. As expected, the values of spirometry parameters of lung function in patients with severe and very severe COPD (GOLD 3 and 4) were significantly worse than those in patients with moderate COPD (GOLD 2). Frequency of current smokers was not different among investigated groups.

The effects of tobacco smoke on the functional activity of A1AT (SIA-Trypsin and SIA-Elastase), serum level of A1AT, and level of OxyA1AT, which were obtained in control group and in patients with COPD are shown in Figure 1. One-way ANOVA and post hoc tests revealed that: SIA-Trypsin was decreased in COPD patients than in control, regardless of their smoking status (Figure 1a) (COPD smokers vs. control no-smokers $p = 0.002$, COPD no-smokers vs. control smokers $p = 0.017$, COPD no-smokers vs. control nonsmokers $p < 0.001$, difference between COPD smokers and control group smokers was close to significance $p = 0.063$); SIA-Elastase was decreased in COPD smokers than in control no-smokers ($p = 0.032$) and COPD no-smokers (differences were close to significance $p = 0.069$) (Figure 1b); serum level of A1AT was increased in COPD smokers than in control no-smokers ($p = 0.011$) (Figure 1c); OxyA1AT level was increased in COPD smokers than in control no-smokers ($p = 0.030$) and COPD no-smokers ($p = 0.009$) (Figure 1d).

The main results of Spearman's correlation analysis are presented in Table 2. Significant inverse relation was found

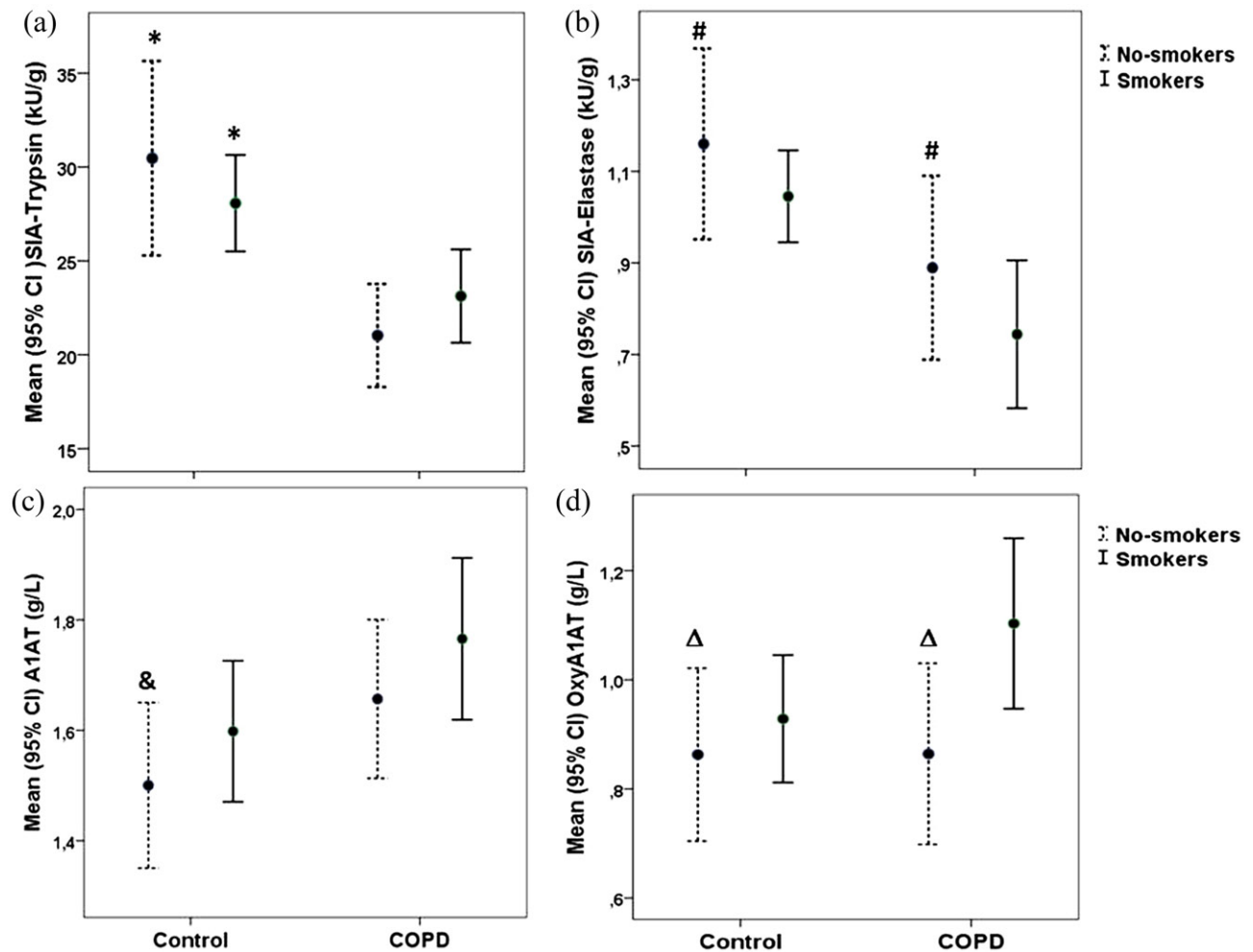


Figure 1 Smoking-related mean values (95% confidence interval) obtained in control group (29 no-smokers and 17 smokers) and patients with COPD (32 no-smokers and 33 smokers) for: (a) SIA-Trypsin (*significant difference to COPD smokers and COPD no-smokers), (b) SIA-Elastase (#significant difference to COPD smokers), (c) levels of A1AT (& significant difference to COPD smokers), (d) OxyA1AT (Δ significant difference to COPD smokers).

Table 2 Spearman's correlation analysis between parameters of functional activity of A1AT (SIA-Trypsin and SIA-Elastase) and OxyA1AT.

Group	Correlated parameters	
	OxyA1AT and SIA-Trypsin	OxyA1AT and SIA-Elastase
Control-all	-0.247 (0.188)	-0.640 (<0.001)
Control no-smokers	-0.342 (0.179)	-0.671 (<0.001)
Control smokers	-0.077 (0.802)	-0.640 (<0.001)
COPD all	-0.386 (0.024)	-0.919 (<0.001)
COPD no-smokers	-0.442 (0.066)	-0.927 (<0.001)
COPD smokers	-0.284 (0.286)	-0.890 (<0.001)

*Data presented as Spearman's correlation coefficient (*p* value)

between SIA-Elastase and serum level of OxyA1AT in all investigated groups. However, the stronger inverse relation was found in groups of COPD no-smokers and COPD smokers (Spearman's *R*: -0.927 and -0.890, respectively), than it was found in no-smokers and smokers in control group (Spearman's *R*: -0.671 and -0.640, respectively).

Figure 2 presents smoking-related levels of OxyA1AT and SIA-Elastase in the control group and in two patient groups divided according to the severity of the disease (GOLD 2 group: patients with moderate COPD, and GOLD 3+4 group: patients with severe and very severe COPD). Mean values of SIA-Elastase in GOLD 3+4 group who were no-smokers was lower than in healthy no-smokers

(*p* = 0.037). The lowest value of SIA-Elastase was found in group of COPD-smokers with severe and very severe stages of disease, and it was significantly lower than in both healthy smokers and no-smokers (*p* = 0.034, *p* = 0.001, respectively). Contrary to that, COPD-smokers with end-stage of disease had the highest level of OxyA1AT, in comparison to all other investigated groups (vs. control no-smokers, *p* = 0.009; vs. control smokers, *p* = 0.033; vs. GOLD 2 smokers, *p* = 0.022, and vs. GOLD 3+4 no-smokers, *p* = 0.038).

Discussion

In the past fifty years, since the discovery of the hereditary A1ATD, many epidemiological studies have investigated the association between this genetic abnormality and the onset of the COPD. However, in clinical practice of the diagnosis, prevention and monitoring of COPD, non-hereditary functional deficiency of A1AT caused by its oxidative modification is overlooked. Mostly due to the lack of a suitable and inexpensive method that would be used for assessment of the oxidative modified A1AT in routine laboratory practice.

In this study, COPD patients who were smokers had significantly higher levels of serum A1AT than healthy no-smokers (Figure 1c). A1AT as an acute phase protein increases rapidly (3- to 4-fold) in response to inflammation or infection (16). The obtained raised level of A1AT in COPD patients was expected, considering that the COPD is characterized by lung inflammation. Our results agree with the data obtained by Serapinas et al. (17), who found an elevated level of A1AT in COPD smokers, with the continued elevation of A1AT, even after cessation of smoking. The similar influence of smoking on serum level of A1AT was found in general population (18) that is dose-dependent, with highest A1AT levels in active smokers who consume at least 15 cigarettes per day. Moreover, the twenty-five year follow-up study revealed that the raised plasma level of A1AT was associated with an increased incidence of COPD exacerbations which require hospitalization (19). An association between elevated level of A1AT in exhaled breath condensate and COPD exacerbations was revealed too (20).

Contrary to the increased immunoreactive serum level of A1AT, the SIA-Elastase was significantly decreased in COPD-smokers in comparison with COPD no-smoker and no-smokers in control group (Figure 1b). Similarly, data from literature showed the significant decreased inhibitory activity of A1AT to elastase in lavage fluid from the epithelial surface of the lower respiratory tract in asymptomatic smokers and smokers with idiopathic pulmonary fibrosis (21). In vitro kinetics study (22) conducted with A1AT isolated from lungs has shown that cigarette smoking is associated with the significant reduction of association rate constant of A1AT for NE. All of these findings indicate that the serum level of A1AT has limited diagnostic accuracy in evaluation of functional capacity of A1AT to protect the respiratory tract from the proteolytic activity of NE.

Besides previously mentioned decreased functional activity of A1AT which was estimated as SIA-Elastase in COPD smokers (Figure 1b), another important finding in this study is highest level of OxyA1AT in COPD smokers in relation to no-smokers in both COPD and control groups (Figure 1d). Interestingly, the OxyA1AT was in strong inverse relation with SIA-Elastase in COPD-patients (Spearman's R was -0.919), however in control group the inverse relation was moderate (Spearman's R was -0.640) (Table 2). This data qualifies the SIA-Elastase and level of OxyA1AT as specific biomarkers for the assessment of functional inactivation of A1AT associated with COPD in smokers. Moreover, the highest serum level of OxyA1AT was found in group of smokers with severe and very severe stage of COPD, while the SIA-Elastase was the lowest in the same group of patients (Figure 2). Similarly, Fujita et al. (23) found that inhibitory capacity of A1AT, measured in bronchoalveolar lavage fluid (BAL), correlated inversely with emphysema severity.

To our best knowledge, this study has shown, for the first time that increased serum level of OxyA1AT, which was induced by smoking, is associated with a worse prognosis of COPD. These data contribute to highlighting the significant role of smoking-related oxidative stress in pathogenesis of

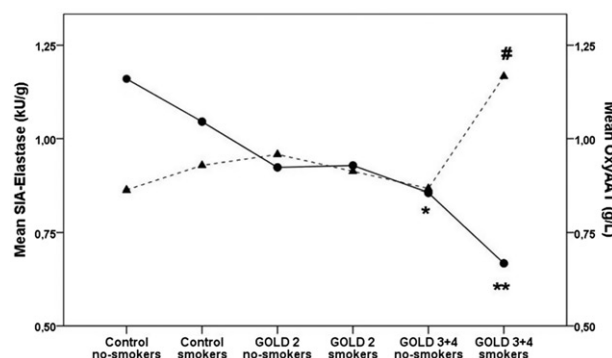


Figure 2. Smoking-related mean values of SIA-Elastase (full line, label for mean values ●) and OxyA1AT (dashed line, label for mean values ▲) in control group (29 no-smokers, 17 smokers) and patients divided into two groups according to COPD severity (11 no-smokers with GOLD 2; 7 smokers with GOLD 2; 21 no-smokers with GOLD 3 + 4; 26 smokers with GOLD 3 + 4); *difference of SIA-Elastase in relations to control no-smokers; **difference of SIA-Elastase in relations to control no-smokers and control smokers; # difference of OxyA1AT in relations to control no-smokers and smokers; smokers with GOLD 2 and no-smokers with GOLD 3 + 4.

COPD, as well as the importance of the application of OxyA1AT as a biomarker in clinical practice. The pro-oxidative species which are delivered to lungs by the tobacco smoke and/or by stimulated inflammatory cells are involved in several mechanisms responsible for oxidative damage of A1AT (11). The main target of oxidative modification is active center of A1AT at Met³⁵⁸ to methionine sulfoxide, which consequently decreases the second order rate constant for association with NE (9, 24). In support of this, Carp et al (25) identified methionine sulfoxide in purified A1AT from healthy smokers' BAL fluids, while in the nonsmokers' BAL fluid it was not found. In the same study was shown decrease of the elastase inhibitory capacity of A1AT for 40% in smokers' BAL fluid compared to no-smokers, which suggest that methionine oxidation may be the cause of decreased functional activity of A1AT in the lungs of the smokers.

It is well known that tobacco smoke abounds with pro-oxidants such as hydrogen peroxide, nitrogen dioxide, and transition metals. In case of the reduced antioxidant defense, these pro-oxidants can cause the oxidative stress-related inactivation of A1AT. Additionally, inflammatory cells at sites of acute or chronic inflammation liberate a number of reactive species and create the microenvironment which contributes to the oxidative inactivation of A1AT. Smoking, by itself provokes infiltration of neutrophils and alveolar macrophage in the lower respiratory tract which induces the release of a spectrum of oxidants and pro-oxidative enzymes that may inactivate A1AT in their local environment. As already mentioned, the oxidants released by inflammatory cells could oxidize A1AT, perpetuating the cycle and potentially contributing to the pathogenesis of COPD. Both risk factors, released proteases from triggered phagocytes and the reduced activity of anti-proteases, could be involved in lung tissue damage (26). Besides the loss of the anti-elastase activity, the OxyA1AT takes on the other biological properties which are involved in the pathogenesis of COPD. Activated myeloperoxidase-hydrogen peroxide system (MPO-H₂O₂) could oxidize the A1AT. The oxidized A1AT has a tendency

to form complexes with IgA, and to lose inhibitor activity to proteases (27). A few studies revealed immunomodulatory role of OxyA1AT. One of them found that OxyA1AT could activate the monocytes (28). Other study revealed that OxyA1AT-generated in the airway interacts directly with epithelial cells to release chemokines IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which in turn attracts macrophages and neutrophils into the airways (29).

Conclusions

The level of A1AT is commonly used in clinical practice as an initial diagnostic biomarker of hereditary A1ATD associated with the premature onset of pulmonary emphysema. However, we have shown that serum biomarkers which are relatively simple for determination and inexpensive, SIA-Elastase and OxyA1AT may improve diagnosis, management, and prevention of COPD in clinical practice. The potential utility of OxyA1AT in clinical practice could be in the prevention of COPD progression, both in emphysema caused by inherited A1ATD, as well as in acquired functional deficiency of A1AT caused by smoking-induced oxidative stress. In many studies were evaluated various biomarkers of oxidative stress associated with COPD onset and severity (reviewed in Ref. 30). However, the advantage of OxyA1AT as potential biomarker of oxidative stress specific for COPD is its direct involvement in the pathogenesis of COPD. On the other hand, clinical significance of OxyA1AT as a prognostic biomarker could be in assessing the effectiveness of antioxidant therapy for COPD and emphysema.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by grants 173008 from the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

References

- World Health Organization. [Internet] Updated 2018. Available from: <http://www.who.int/respiratory/copd/causes/en>.
- Shaykhiev R, Crystal RG. Early events in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Smoking-induced reprogramming of airway epithelial basal progenitor cells. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(Suppl 5):S252–S258. doi:10.1513/AnnalsATS.201402-049AW.
- Zuo L, He F, Sergakis GG, Koozehchian MS, Stimpfl JN, Rong Y, Diaz PT, Best TM. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(3):L205–L218. doi:10.1152/ajplung.00330.2013.
- Bhalla DK, Hirata F, Rishi AK, Gairola CG. Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12(1):45–64. doi:10.1080/10937400802545094.
- Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2011;6:413–421. doi:10.2147/COPD.S10770.
- Lieberman J, Benjamin W, Sastre A. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest*. 1989;93(3):370–373. PMID: 3485034.
- Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*. 2008;90(2):227–242. doi:10.1016/j.biochi.2007.10.009.
- Johnson D, Travis J. The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem*. 1979;254(10):4022–4026. PMID: 312289.
- Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, Levine RL. Oxidation of either methionine³⁵¹ or methionine³⁵⁸ in α 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000;275(35):27258–27265. doi:10.1074/jbc.M004850200.
- Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 1985;1(8421):152–154. PMID: 2857224.
- Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking, emphysema and damage to alpha 1-proteinase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1994;266:L593–L611. doi:10.1152/ajplung.1994.266.6.L593.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. [Internet] Updated 2018. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
- Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*. 1955;16(4):570–575. PMID: 14389277.
- Bieth J, Spiess B, Wermuth CG. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med*. 1974;11(4):350–357. PMID: 4429553.
- Beatty K, Robertie P, Senior RM, Travis J. Determination of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor in serum. *J Lab Clin Med*. 1982;100(2):186–192. PMID: 6178785.
- Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. 2011;105(8):1129–1139. doi:10.1016/j.rmed.2011.02.002.
- Serapinas D, Narbekovas A, Juskevicius J, Sakalauskas R. Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status. *Multidiscip Respir Med*. 2011;6(4):214–219. DOI: 10.1186/2049-6958-6-4-214.
- Senn O, Russi EW, Schindler C, et al. Circulating alpha1-antitrypsin in the general population: determinants and association with lung function. *Respir Res*. 2008;9:35. doi:10.1186/1465-9921-9-35.
- Engström G, Segelstorm N, Ekberg-Aronsson M, Nilsson PM, Lindgärde F, Löfdahl CG. Plasma markers of inflammation and incidence of hospitalisations for COPD: results from a population-based cohort study. *Thorax*. 2009;64(3):211–215. doi:10.1136/thx.2008.102079.
- Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Koepke J, Jörres RA, Nell C, Schmid S, Vogelmeier C, Bals R. Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respir Med*. 2012;106(1):120–126. doi:10.1016/j.rmed.2011.06.015.
- Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*. 1979;206(4424):1315–1316. PMID: 316188.
- Ogushi F, Hubbard RC, Vogelmeier C, Fells GA, Crystal RG. Risk factors for emphysema. Cigarette smoking is associated with a reduction in the association rate constant of lung alpha 1-antitrypsin for neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 1991;87(3):1060–1065. doi:10.1172/JCI115066.
- Fujita J, Nelson NL, Daughton DM, Dobry CA, Spurzem JR, Irino S, Rennard SI. Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(1):57–62. doi:10.1164/ajrccm/142.1.57.

24. Padrines M, Schneider-Pozzer M, Bieth JG. Inhibition of neutrophil elastase by alpha-1-proteinase inhibitor oxidized by activated neutrophils. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139(3):783–790. doi: [10.1164/ajrccm/139.3.783](https://doi.org/10.1164/ajrccm/139.3.783).
25. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(6):2041–2045. PMID: 6979049.
26. Carp H, Janoff A. Potential mediator of inflammation. Potential mediator of inflammation. Phagocyte-derived oxidants suppress the elastase-inhibitory capacity of alpha 1-proteinase inhibitor in vitro. *J Clin Invest*. 1980;66(5):987–995. doi: [10.1172/JCI109968](https://doi.org/10.1172/JCI109968).
27. Scott LJ, Russell GI, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Oxidation of alpha1-proteinase inhibitor by the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase system promotes binding to immunoglobulin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255(3):562–567. doi: [10.1006/bbrc.1999.0247](https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0247).
28. Moraga F, Janciauskiene S. Activation of primary human monocytes by the oxidized form of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7693–7700. PMID: 10713080.
29. Li Z, Alam S, Wang J, Sandstrom CS, Janciauskiene C, Mahadeva R. Oxidized alpha1-antitrypsin stimulates the release of monocyte chemotactic protein-1 from lung epithelial cells: potential role in emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 297(2):L388–L400. doi: [10.1152/ajplung.90373.2008](https://doi.org/10.1152/ajplung.90373.2008).
30. Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Carru C, Pirina P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Respir Res*. 2016;17(1):150. doi: [10.1186/s12931-016-0471-z](https://doi.org/10.1186/s12931-016-0471-z).

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

03 br. 5/121
03. 10. 2016. godine

Na osnovu člana 92. Zakona o visokom obrazovanju Republike Srbije i čl. 84. Statuta Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, prodekan Fakulteta je dana 30. 09. 2016. godine, donela

REŠENJE

ODOBRAVA se Milovanović Vera, studentu Farmaceutskog fakulteta, indeks br. 27/14, mirovanje prava i obaveza studenta za školsku 2016/17. godinu.

Obrazloženje

Milovanović Vera, student na studijskom programu DAS - Medicinska biohemija podneo je zahtev 03 br. 5/121 od 19. 09. 2016. godine prodekanu za nastavu Fakulteta da mu se odobri mirovanje prava i obaveza za školsku 2016/17 godinu. Uz molbu je priložio odgovarajuću dokumentaciju.

Prodekan Fakulteta je razmatrala zahtev 30. 09. 2016. godine i ocenila da je zahtev osnovan, te je doneto rešenje kao u dispozitivu.

PRAVNA POUKA: Protiv ovog rešenja imenovani ima pravo prigovora dekanu Fakulteta u roku od 8 (osam) dana od dana prijema istog.

Rešenje dostaviti: Imenovanom, dekanu, prodekanu za nastavu, sekretaru, Odseku za nastavu i studentska pitanja i arhivi.

PRODEKAN ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU
I KONTINUIRANU EDUKACIJU


Prof. dr Biljana Antonijević


6. 10. 2016.

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

03 br. 4/171
30.09.2021. godine

Na osnovu Statuta Univerziteta u Beogradu, prodekan Fakulteta je dana 30.09.2021. godine, donela

ODLUKU

ODOBRAVA se Bepa Munobahović, studentu Farmaceutskog fakulteta, indeks br. 27/14, produžetak roka za završetak studija za školsku 2021/22.

Obrazloženje

Bepa Munobahović, student na studijskom programu DAS : M. Onoxenija, podneo je zahtev 03 br. 4/171 od 30.09.2021. godine prodekanu Fakulteta da mu se odobri produžetak roka za završetak studija.

Prodekan Fakulteta je razmatrala zahtev 30.09.2021. godine i ocenila da je zahtev osnovan, te je doneto rešenje kao u dispozitivu.

PRAVNA POUKA: Protiv ove odluke imenovani ima pravo prigovora dekanu Fakulteta u roku od 8 (osam) dana od dana prijema istog.

Odluku dostaviti: Imenovanoj-om, dekanu i Odseku za nastavu i studentska pitanja.

PRODEKAN ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU
I KONTINUIRANU EDUKACIJU

Prof. dr Sandra Vezmar Kovačević



[Handwritten signature]

7.10.2021.

Bepa Munobahović

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
03 бр. 4/200-18
Дана 30.09.2022. године

На основу Статута Универзитета у Београду, продекан Факултета је дана 30.09.2022. године, донела

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА се **ВЕРИ МИЛОВАНОВИЋ**, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 27/14, продужетак рока за завршетак студија за школску 2022/2023.

Образложење

ВЕРА МИЛОВАНОВИЋ, студент на студијском програму ДАС – Медицинска биохемија, поднео је захтев 03 бр. 4/200-18 од 30.09.2022. године продекану Факултета да му се одобри продужетак рока за завршетак студија.

Продекан Факултета је разматрала захтев 30.09.2022. године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против ове одлуке именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Одлуку доставити: Именованој-ом, декану и Одсеку за наставу и студентска питања.

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ
НАСТАВУ
И КОНТИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ



Проф. др Сандра Везмар Ковачевић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Посл.број: 3/201

Дана 29.09.2023. године

На основу Статута Универзитета у Београду, продекан Факултета је дана 29.09.2023. године, донела

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА се ВЕРИ МИЛОВАНОВИЋ, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 27/14, продужетак статуса студента у школској 2023/2024.години.

Образложење

ВЕРА МИЛОВАНОВИЋ, студент на студијском програму ДАС – Медицинска биохемија, поднела је захтев број 3/201 од 29.09.2023. године продекану Факултета да јој се одобри продужетак статуса студента у школској 2023/2024.години.

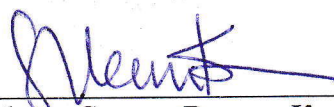
Продекан Факултета је разматрала захтев 29.09.2023. године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против ове одлуке именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Одлуку доставити: Именованој-ом, декану и Одсеку за наставу и студентска питања.

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ
НАСТАВУ
И КОНТИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ




Проф. др Сандра Везмар Ковачевић