

NAU NOM VE U MEDICINSKG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 13.06.2016. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Zna aj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa filadelfija-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama“

kandidata Mr sci med dr Dijane Šefer, zaposlene na Klinici za hematologiju Klini kog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Predrag Milji , komentor NS dr Vladan oki .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Mirjana Goti , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof dr Andrija Bogdanovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ivana Uroševi , profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija Mr sci med dr Dijane Šefer napisana je na ukupno 133 strane i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, radna hipoteza, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 32 tabele,12 grafikona, 2 sheme i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** su opisane osnovne karakteristike mijeloproliferativnih neoplazmi i navedena je aktuelna klasifikacija ove grupe bolesti na podtipove prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije. Opisana je molekularna patogeneza mijeloproliferativnih neoplazmi. Navedeni su kriterijumi za dijagnozu podtipova: policitemije vere, esencijalne trombocitemije i primarne mijelofibroze. Opisani su tip, u estalost i lokalizacija

tromboembolijskih komplikacija, koje predstavljaju vode i uzrok morbiditeta i mortaliteta u ovim bolestima. Navedeni su do sada poznati faktori rizika za trombozu, koji su potvrđeni velikim kliničkim studijama u ovim bolestima. Tako je opisan postupak stratifikacija bolesnika sa mijeloproliferativnim neoplazmama na osnovu rizika za pojavu tromboze, ali je istaknuto da su sadašnji modeli stratifikacije prema riziku za trombozu relativno nepouzdan. To je najpre posledica činjenice da ovi modeli ne uključuju faktore koji su važni za nastanak tromboze. U uvodnom delu je opisano savremeno shvatanje mehanizama koji dovode do protrombogenog stanja i trombotičnih komplikacija kod bolesnika sa mijeloproliferativnim neoplazmama. Poseban osvrt bio je posvećen mehanizmima ćelijskih interakcija i stvaranja leukocitno-trombocitnih agregata kao i njihovom značenju za nastanak trombofilnog stanja. Istaknuto je da i pored toga što je ispitivan u nekoliko retrospektivnih studija, prognostički značaj leukocitno-trombocitnih agregata za nastanak tromboembolijskih komplikacija još uvek nije definisan.

Primarni cilj rada podrazumeva ispitivanje prediktivnog značaja markera aktivacije ćelija krvi i endotela za nastanak tromboembolijskih događaja u mijeloproliferativnim neoplazmama. Kao ciljevi rada su takođe navedeni ispitivanje povezanosti mutacija u genima (JAK2, MPL i TET2) i karakteristika *in vitro* rasta prethodnika hematopoeze sa tromboembolijskim događajima. Na kraju, jedan od ciljeva rada je ispitivanje uticaja mijelosupresivne terapije na markere aktivacije ćelija krvi i endotela.

U poglavlju **bolesnici, materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj kohortnoj studiji koja je sprovedena u Klinici za hematologiju KCS. Istraživanje je obavljeno u dve faze: prva je obuhvatala period neposredno posle postavljanja dijagnoze mijeloproliferativne neoplazme, a zatim ispitivanje njenog uticaja i druga posle postizanja odgovora na primenjenu terapiju. Detaljno su opisani kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju i plan laboratorijskih ispitivanja. Metodologija korištena u ovom radu je moderna i postupak svih analiza je detaljno opisan, a za potrebe dobijanja opsega referentnih vrednosti laboratorijskih analiza koje se ne rade standardno, u studiju su osim pacijenata sa mijeloproliferativnim neoplazmama uključeni i zdravi ispitanici. Takođe su detaljno objašnjeni kriterijumi za dijagnozu tromboembolijskih komplikacija, kao i dužina i način njihovog praćenja. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti i zdravi ispitanici su bili informisani o svrsi prikupljanja biološkog materijala za eksperimentalni rad i od njih je dobijena saglasnost za učestvovanje u studiji.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 176 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U studiju je uključeno 95 bolesnika sa filadelfijskim negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama (Ph⁻MPN): 39 sa policitemijom verom (PV), 27 sa esencijalnom trombocitemijom (ET) i 29 sa primarnom mijelofibrozom (PMF). Standardni faktori rizika za trombozu bili su prisutni kod 53.7% ispitivanih bolesnika, odnosno starost preko 60 godina je imalo je 49.5%, a pozitivnu istoriju tromboza 12.6% bolesnika. Najveća učestalost standardnih faktora rizika za trombozu je registrovana u grupi bolesnika sa primarnom mijelofibrozom. Ukupna učestalost kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu (arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, dijabetes melitus, pušenje) je bila značajno veća u grupi bolesnika sa Ph⁻MPN, nego u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika (84.2% vs 27.3%).

Nivoi celularnih i humoralnih markera aktivacije leukocita i trombocita su analizirani u vreme dijagnoze Ph⁻MPN i posle primljene terapije. Prosečne vrednosti leukocitno-trombocitnih (neutrofilno-trombocitnih i monocitno-trombocitnih) agregata su na dijagnozi bile povećane u PV, ET i PMF u odnosu na nivoe u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika ($p < 0.01$), ali bez značajnih razlika između podtipova Ph⁻MPN. Povećani nivoi neutrofilno-trombocitnih agregata su detektovani kod 61.5% PV, 77.8% ET i 62.1% PMF bolesnika. Povećani nivoi monocitno-trombocitnih agregata su detektovani kod 38.5% PV, 48.1% ET i 48.3% PMF bolesnika. Posle primene terapije, prosečne vrednosti neutrofilno-trombocitnih agregata u PV su redukovane na normalu, dok su se u ET i PMF zadržale značajno povišene vrednosti ($p < 0.01$). Prosečne vrednosti monocitno-trombocitnih agregata su se posle terapije normalizovale u PV i PMF, ali su u ET ostale značajno povišene ($p < 0.05$). Prosečni nivoi solubilnih selektina (E-, L- i P) su na dijagnozi takođe bili značajno povišeni u svim podtipovima Ph⁻MPN, u odnosu na grupu zdravih ispitanika. Rezultati merenja nivoa solubilnih selektina posle primenjene citoreduktivne terapije kod selektovane grupe bolesnika sa Ph⁻MPN, koji su inicijalno imali povećane nivoe, su pokazali značajno sniženje u odnosu na nivoe izmerene u vreme postavljanja dijagnoze Ph⁻MPN ($p < 0.01$).

Tokom perioda pra enja koji je iznosio 39 meseci, tromboembolijske komplikacije su se dogodile kod 12.6% bolesnika sa Ph^hMPN: 4.2% PV, 3.16% ET i 5.26% PMF. Me u trombozama koje su se dogodile u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN, naj eš i je bio cerebrovaskularni insult (50%), dok su tromboze svih ostalih lokalizacija (akutni infarkt miokarda, infarkt slezine, tromboza distalne aorte, plu na embolija, duboka venska tromboza donjih ekstremiteta, tromboflebitis površinskih vena donjih ekstremiteta) bile podjednako zastupljene (po 8.33%). Izvršena je analiza u estalosti pojedinih faktora rizika za trombozu izme u grupa bolesnika sa Ph^hMPN sa i bez novih tromboza. Me u kardiovaskularnim faktorima rizika, u estalost arterijske hipertenzije je bila zna ajno ve a u grupi bolesnika sa trombozama ($p < 0.05$). Tako e, prose ni nivoi solubilnog P-selektina su bili zna ajno ve i u grupi bolesnika sa trombozama ($p < 0.05$). Prose ne vrednosti nivoa neutrofilno-trombocitnih i monocitno-trombocitnih agregata, kao i nivoa solubilnih E- i L- selektina se nisu zna ajno razlikovale me u ispitivanim grupama bolesnika. Sa ciljem da se ispita protrombogeni uticaj aktiviranih leukocita i trombocita, kao i svih ostalih parametara koji su u literaturi dovedeni u vezu sa pove anim vaskularnim rizikom, primenjena je COX regresiona analiza. U multivarijantnoj COX regresionoj analizi je potvr eno da pove an nivo monocitno-trombocitnih agregata kod bolesnika sa Ph^hMPN predstavlja nezavistan prediktor tromboze (HR=1.561, 95% CI:1.007-2.420, $p=0.046$). Tako e je potvr eno da interakcija izme u povišenih nivoa monocitno-trombocitnih agregata i arterijske hipertenzije zna ajno pove ava rizik za nastanak tromboze (HR=1.975, 95% CI:1.215-3.212, $p=0.006$).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Pove anje nivoa leukocitno-trombocitnih agregata iznad fizioloških vrednosti se naj eš e vi a u bolestima i stanjima povezanim sa inflamacijom i trombozama (Cerletti C I sar, 2012; Radovan evi R I sar, 2009.), kakvo tako e postoji i u Ph^hMPN. U ovoj studiji, merenjem nivoa cirkulišu ih leukocitno-trombocitnih agregata metodom proto ne citometrije, je utvr eno da u cirkulaciji bolesnika sa Ph^hMPN postoji pove an procenat *in vivo* aktiviranih leukocita i trombocita u pore enju sa zdravim kontrolnim ispitanicima, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljenih studija (Arrellano-Rodrigo E i sar, 2006; Villmov T i sar, 2003; Falanga A i sar, 2005; Alvarez-Larran A i sar, 2008; Coucelo M i sar, 2014.). U ovom prospektivnom istraživanju je utvr eno da postoji pozitivna korelacija izme u nivoa cirkulišu ih leukocitno-trombocitnih agregata i pove ane sklonosti ka trombozi bolesnika sa Ph^hMPN. Posredstvom multivarijantnog COX proporcionalnog hazard regresionog modela, potvr eno je da pove anje bazi nih vrednosti monocitno-trombocitnih agregata predstavlja

nezavistan prediktivni faktor za pojavu tromboze. U literaturi nema podataka o sli nom prospektivnom ispitivanju, ali su rezultati ranijih retrospektivnih studija tako e ukazuju na zna aj povišene koncentracije leukocitno-trombocitnih agregata za nastanak tromboembolijskih doga aja (Coucelo M i sar, 2014; Jensen MK i sar, 2001.).

P-selektin je u literaturi tako e ozna en kao senzitivan marker aktivacije trombocita i njegove pove ane vrednosti u cirkulaciji su utvr ene u mnogim klini kim situacijama udruženim sa trombozom (Frijns CIM i sar, 1997; Griesshammer M i sar, 1999; Falanga A i sar, 1999.). Zna ajno pove ane koncentracije solubilnog P-selektina su prethodno eksperimentalno potvr ene i u Ph⁺MPN (Robertson B i sar, 2007.), ali njihova povezanost sa pove anom sklonoš u ka trombozama nije dokazana. Prisustvo pove anih nivoa solubilnog P-selektina je do sada dokazano kod bolesnika sa tromboembolijskim komplikacijama u okviru PMF (Alvarez-Larran A i sar, 2008.), dok je pove ana ekspresija membranskog P-selektina dokazana kod bolesnika sa ET i trombozom (Arrellano-Rodrigo E i sar, 2006.), ime je podržana teorija o ulozi aktiviranih trombocita u trombogenezi. Iako je prose an nivo solubilnog P-selektina u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN i trombozama bio zna ajno ve i u pore enju sa grupom bolesnika koja nije imala novih tromboza, prediktivna vrednost ovog parametra za trombozu nije potvr ena.

Prediktivni zna aj kardiovaskularnih faktora rizika za pove anje sklonosti ka trombozama je potvr en u ET i uklju en u scoring sistem za stratifikaciju bolesnika u grupe rizika (IPSET-thrombosis) (Barbui T i sar, 2012.), ali još uvek nije potvr en u PV i PMF. Me utim, na osnovu rezultata ove studije, arterijska hipertenzija se izdvojila kao nezavisni faktor rizika za pojavu tromboze u celoj grupi bolesnika sa MPN. Rezultati multivarijantne COX regresione analize su pokazali da je interakcija izme u nivoa monocitno-trombocitnih agregata i arterijske hipertenzije aditivna. To zna i da ukoliko bolesnik sa Ph⁺MPN pored pove anih bazi nih vrednosti monocitno-trombocitnih agregata ima i arterijsku hipertenziju kao komorbiditet, svako dalje pove anje nivoa monocitno-trombocitnih agregata e dodatno pove ati rizik za pojavu tromboze.

Iako je protromboti ni uticaj JAK2V617F mutacionog statusa i/ili alelnog optere enja u PV, ET i PMF dokazan u mnogim studijama (Barbui T i sar, 2010; Vannucchi AM i sar, 2007; Lussana F i sar, 2009; Borowczyk M i sar, 2015.), on me utim nije potvr en u ovom istraživanju. S obzirom na podatke iz literature koji su potvrdili zna aj visokog JAK2V617F alelnog optere enja (> 50%) kao nezavisnog prediktora venskih tromboza u MPN

(Borowczyk M i sar, 2015.), izostanak takve korelacije u ovoj studiji bi se mogao objasniti predominacijom arterijskih tromboza me u bolesnicima sa Ph⁺MPN.

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

Dijana Šefer, Sandra Bizi -Radulovi , Nada Kraguljac-Kurtovi , Andrija Bogdanovi , Vladan oki , Predrag Milji , Bojana Beleslin- oki , Vesna Kneževi , Olivera Mitrovi -Ajt , Danijela Lekovi , Mirjana Goti . „Proliferative characteristics of Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms - clinical implications“. International Journal of Laboratory Hematology (2016).

E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „Zna aj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa filadelfija-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama“ Mr sci med dr Dijane Šefer, je prva studija u kojoj su markeri aktiviranih leukocita i trombocita prospektivno istraživani kao potencijalni faktori rizika za trombozu. Njen originalni nau ni doprinos se sastoji u razumevanju uticaja pre svega aktiviranih leukocita i trombocita, ali i drugih faktora rizika (starost, istorija prethodnih tromboza, kardiovaskularni faktori rizika, genske mutacije, in vitro proliferativna aktivnost) na nastanak tromboembolijskih komplikacija u Ph⁺MPN. Ova teza ima nesumnjivo zna ajan doprinos u prepoznavanju faktora koji pove avaju rizik za pojavu tromboze i identifikaciji bolesnika sa pove anim rizikom za ove komplikacije. Sasvim je jasno da je izabran najbolji na in za nalaženje faktora koji mogu pomo i u identifikovanju bolesnika sa Ph⁺MPN, koji su pod pove anim rizikom za razvoj tromboza. Rezultati ove studije ukazuju na to da uprkos terapiji prilago enoj stepenu rizika procenjenom primenom dosadašnjeg modela, zna ajan procenat bolesnika sa Ph⁺MPN dobija tromboembolijske komplikacije posle dijagnoze mijeloproliferacije. Rezultati tako e ukazuju na to da pove ani nivoi monocitno-trombocitnih agregata predstavljaju nezavistan prediktor za pojavu tromboze. Konkomitantno prisustvo arterijske hipertenzije dodatno potencira prediktivnu ulogu monocitno-trombocitnih agregata. Na taj na in pove ana koncentracija monocitno- trombocitnih agregata se izdvojila kao nezavisni faktor rizika za pojavu tromboti nih komplikacija. Znaju i da je smanjenje rizika za trombozu primarni cilj terapije u Ph⁺MPN, specijalnu pažnju bi trebalo obratiti na le enje arterijske hipertenzije. S obzirom na nalaz da pove anje bazalnog nivoa monocitno-

trombocitnih agregata predstavlja nezavistan prediktor za trombozu u Ph^hMPN, za o ekivati je da odre ivanje ovog parametra omogu i precizniju identifikaciju bolesnika sa pove anim rizikom od tromboze.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima savremenog nau nog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, nau ni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Mr sci med dr Dijane Šefer i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05.08.2016.

lanovi Komisije:

Prof. dr Mirjana Goti

Prof. dr Andrija Bogdanovi

Prof. dr Ivana Uroševi

Mentor:

Prof. dr Predrag Milji

Komentor:

NS. dr Vladan oki
