

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.03.2018. godine, broj 5940/15-PR, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj klonalnosti B limfocita i polimorfizama gena za citokine na težinu kliničke slike i pojavu monoklonske gamapatije u bolesnika sa Goševom bolešću“

kandidata dr Predraga Rodića, zaposlenog u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu.
Mentor je Prof. dr Dragana Janić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nada Suvajdžić Vuković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Dušan Popadić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N. sav. dr Sonja Pavlović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Predraga Rodića napisana je na ukupno 103 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metodi, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno jedna shema, šest tabela, tri grafikona i četiri slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je jasno definisano šta je to Goševa bolest, epidemiologija bolesti, osvrt na etiologiju i patogenezu, kao i karakteristična klinička slika na osnovu koje se ovo oboljenje klasifikuje na tri klinička tipa (tip 1, 2 i 3). Potom je naveden jedan od sistema skorovanja težine kliničke slike koji omogućava poređenje među bolesnicima sa različitim fenotipom i različitim stepenom izraženosti kliničkih simptoma i znakova bolesti. Obzirom na predmet doktorske teze, poseban osvrt je stavljen na hematološke manifestacije bolesti. Potom su jasno

izložene dijagnozne metode kao i laboratorijske osobenosti ovog oboljenja uključujući i biološke markere, a potom i principi lečenja Goševove bolesti uključujući kako specifičnu terapiju tako i metode suportivne terapije. U sledećoj celini je navedena uloga makrofaga i različitih citokina u citopatološkim mehanizmima Goševove bolesti i povezanost Goševove bolesti sa malignim oboljenjima, posebno sa multiplim mijelomom. S tim u vezi je prikazana i patogeneza multiplog mijeloma, a posebno značaj monoklonske gamapatije u navedenoj patogenezi. Potom je, takođe u skladu sa ciljevima rada, obrađena struktura i funkcija imunoglobulinskih gena i njihova uloga u razviću B limfocita, sa posebnim osvrtom na *IGH* genski lokus i proces somatske hipermutacije kao način uvođenja heterogenosti u antigenski repertoar B-limfocita.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja prisustva i eventualne ekspresije klonalnih rearanžmana gena za teški lanac imunoglobulina (*IGH*) kao i njihove povezanosti sa težinom Goševove bolesti. Takođe je kao cilj rada navedena i procena učestalosti polimorfnih alela citokinskih gena (*TNF*, *IL6* i *IL10*) važnih u procesu inflamacije kod ispitanika, i to u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima iz srpske populacije, kao i uticaj navedenih genskih polimorfizama na težinu bolesti.

U poglavlju **materijal i metode** su navedene karakteristike ispitanikai studije: način uzorkovanja krvi, da se radi o prospektivnoj studiji koja je sprovedena u Klinici za hematologiju i u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, dok su uzorci krvi transportovani i obrađivani u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i u Institutu za molekularnu genetiku i genetički inženjering u Beogradu. Detaljno su opisani kriterijumi za isključenje iz studije, kao i kontrolna grupa za poređenje učestalosti genotipova citokinskih gena. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključanja u studiju. Potom su jasno i reproducibilno navedene sve metode korišćene u studiji, redom, uz sledstveno navođenje statističkih metoda korišćenih za deskripciju i analizu dobijenih rezultata.

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 303 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Klonalna proliferacija B-limfocita je otkrivena u značajnom procentu ispitanika (29,6%) tj. u 8/27 bolesnika. U tri od navedenih osam bolesnika, klonalnost je otkrivena samo na nivou *IGH* rearanžmana tj. bez pratećeg serumskog monoklonskog proteina, a u dva je otkrivena i hipergamaglobulinemija. Među 17/27 (63%) bolesnika, za koje su postojali podaci o praćenju, u 4 bolesnika je rearanžman i dalje bio detektabilan, dok se u jednog bolesnika rearanžman izgubio nakon perioda praćenja. Sekvenciranjem rearanžmana, klonalnost je detektovana kod jednog bolesnika koji je tokom perioda praćenja uvek imao detektabilan biklonalni *IGH* rearanžman. Detektovani rearanžman je dodatno analiziran sekvenciranjem, a interpretacija sekvence je pokazala da se radi o dva različita nemutirana *IGH* rearanžmana. Bolesnici sa prisustvom klonskog rearanžmana *IGH* se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na kliničko-laboratorijske varijable: uzrast, pol, skor težine bolesti (SSI), dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze niti inicijalnu koncentraciju feritina u serumu. Bolesnici sa prisustvom monoklonskog proteina se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na gore navedene kliničke i laboratorijske varijable. Bolesnici sa hipergamaglobulinemijom su imali značajno kraće trajanje terapije i značajno višu inicijalnu vrednost feritina u odnosu na bolesnike bez hipergamaglobulinemije.

Poređenjem učestalosti genotipova i alela polimorfizama pojedinačnih nukleotida za gene *TNF*, *IL6* i *IL10* između bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika izabranih iz populacije u Srbiji, nije uočena značajna razlika ni za jedan od navedenih polimorfizama citokinskih gena. Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL10* rs1800871 sa inicijalnom koncentracijom feritina, nađen je značajno veći stepen hiperferitinemije, kod nosilaca C alela, a posebno u grupi bolesnika koji su nosioci homozigotnog CC genotipa. Učestalosti alela za navedeni polimorfizam se nisu razlikovale u odnosu na kliničko-laboratorijske varijable: pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, niti u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana gena *IGH* odnosno hipergamaglobulinemije. Poređenjem učestalosti alela za polimorfizme *IL10* rs1800896, *TNF* rs1800629, *TNF*

rs361525 i IL6 rs1800795 u odnosu na gore navedene kliničko-laboratorijske varijable, nije nađena značajna razlika.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prevalenca monoklonske gamapatije neodređenog značaja (MGUS) u Gošeovoj bolesti (GB) koja se kreće od 0 – 35% (*Arends 2013*) sugerira moguću vezu između ova dva oboljenja. Takođe, MGUS je povezana sa evolucijom bolesti u multipli mijelom (MM) među bolesnicima obolelim od Gošeove bolesti (*Brady 1997*), a opisan je i slučaj bolesnika koji je nakon pojave MGUS razvio MM uz proteinuriju lakih lanaca imunoglobulina (*Harder 2000*). U ovoj studiji, monoklonski protein je detektovan u pet odraslih bolesnika (18,5%), uzrasta 34 – 66 godina (srednja vrednost 49 godina). Navedeni bolesnici se nisu razlikovali od ispitanika sa odsustvom monoklonskog proteina, u odnosu na uzrast, pol, skorovanu težinu bolesti, prisustvo ili odsustvo enzimske supstitucije, nivo hitotriozidaze, feritina, niti prisustvo ili odsustvo slezine. Na osnovu studijskog uzorka ispitanika, izgleda da prisustvo monoklonske gamapatije predstavlja fenomen nezavisan od težine bolesti i od primene supstitucione terapije. Nije poznato da li specifična terapija za GB utiče na pojavu neoplazije. Međutim, dokazano je da supstituciona terapija snižava nivo patološki povišenih citokina i imunoglobulina (*deFost 2008*). Efekti enzimske terapije na MGUS su kontroverzni (*Grosbois 2009*). Nakon što dođe do razvoja klonalne proliferacije B-ćelija, verovatno je da se proces ne može zaustaviti specifičnom enzimskom terapijom.

U grupi bolesnika ispitivanih u studiji, klonalni rearanžman *IGH* gena je otkriven u značajnom procentu ispitanika (8/27 – 29,6%), dok je pet od navedenih osam bolesnika imalo i detektabilan monoklonski protein u serumu. Time preostaju tri bolesnika sa *IGH* rearanžmanom kao jednim markerom klonalne proliferacije limfocita. Kod 17/27 bolesnika (63%) postojali su podaci o praćenju klonske proliferacije, sa prosečnim vremenom praćenja od 5 godina. Među njima je bilo pet bolesnika koji su imali prethodni klonalni rearanžman *IGH* gena. Klonalni rearanžman je ostao isti u četiri bolesnika, međutim, u jednog bolesnika je nestao, nakon perioda praćenja. U preostalim 12/17 bolesnika *IGH* rearanžman nije bio detektabilan ni u jednom momentu. U prethodnoj studiji grupe autora iz istih zdravstvenih ustanova, analizirano je sedmoro dece i 20 odraslih bolesnika sa Gošeovom bolešću (*Rodić 2013*). U 11/27 bolesnika (oko 40%) uočeno je prisustvo klonalnosti B-ćelija posebno u bolesnicima više uzrasne grupe. Među njima, petoro je imalo rearanžman *IGH* gena kako jedini marker klonalnosti B-limfocita. Ovo bi moglo da se objasni poznatom činjenicom da

nisu svi rearanžmani *IGH* gena funkcionalni i ne dovode do produkcije imunoglobulinskih lanaca. Te je kao mogući zaključak navedeno da bi klonalnost B-ćelija mogla potencijalno da bude bolji marker od monoklonskog proteina seruma, tokom praćenja bolesnika pod rizikom za razvoj MM. Osim toga, multipli mijelom može nastati i *de novo* bez prethodne pojave MGUS (Landgren 2006).

Većina kancera zahteva prethodnu klonalnu ekspanziju, međutim nisu svi klonovi maligni (Risitano 2014). Primeri klonalnih poremećaja koji nisu maligne neoplazme su mijelodisplastični sindromi, hronična oboljenja T- i NK-ćelija, mijelofibroza, monoklonske gamapatije, monoklonska B-ćelijska limfocitoza, mastocitoza i paroksizmalna noćna hemoglobinurija. Neki od molekularnih i imunopatogenetskih mehanizama klonskih poremećaja mogu da se preklapaju sa poremećajim u malignoj neoplaziji, međutim nije jasno kako i u kom stepenu klonski poremećaj progredira u malignu neoplazmu, kada ta dva procesa formiraju jedinstveni patološki kontinuum. Poznato je da su neki od ovih klonova samoograničavajući, a neki progrediraju u patološka stanja kao što su neoplazme imunskih ćelija. Sa druge strane, postoji i veza između fiziološke i nefiziološke nemaligne stimulacije imunskog sistema koja formira osnovu za klonalnu selekciju i proliferaciju u stanjima i procesima kao što su stečena imunost, vakcinacija ili autoimuna oboljenja (Risitano 2014). U jednoj ranijoj studiji, uočena je i visoka incidenca antinuklearnih i antikardiolipinskih antitela u bolesnika sa GB, bez kliničkih manifestacija, što je verovatno ilustracija fenomena da hronična stimulacija antigenom (nerazgrađenim lipidnim supstratom) dovodi do nespecifične produkcije autoantitela (Rodić 2013).

Daljom analizom klonalnosti u bolesnika sa pozitivnim klonalnim rearanžmanom *IGH*, klonalnost je bila detektabilna samo u jednog bolesnika koji se prezentovao očiglednim biklonalnim rearanžmanom u prvoj rundi *IGHV-IGHD-IGHJ* analize. Detektovani rearanžman je dalje analiziran sekvenciranjem i nađeno je da je u pitanju nemutirani rearanžman, čiji je sastav *IGHV1-2*04*, *IGHD3-3*02* i *IGHJ4*02*. Međutim kada je analiza ponovljena u istom uzorku, dobijen je drugačiji rearanžman (*IGHV1-69*01*, *IGHD3-3*01*, *IGHJ4*02*). Međutim, mutacioni status sekvenciranog rearanžmana treba uzeti sa rezervom jer su korišćeni FR1 prajmeri te je samo deo rearanžmana amplifikovan. Takođe, korišćeni metod za rearanžman *IGHV* može da otkrije klonove kada je broj B limfocita veći od $5 \times 10^9/L$ što je uobičajeno kod bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom prilikom prezentacije bolesti ili tokom razvoja recidiva, čime se dobija dovoljan broj ćelija za pouzdanu analizu mutacionog statusa. Moguće je da su svi ispitanici izuzev jednog imali niži

broj klonalnih ćelija što je onemogućilo analizu mutacionog statusa iako smo koristili visoko senzitivni metod „nested PCR“. Nestanak klonalnog rearanžmana u jednog bolesnika nakon perioda praćenja kao i niska stopa detekcije klonalnosti se možda može objasniti činjenicom da klonovi i subklonovi u Gošeovoj bolesti dobijaju na veličini i brojnosti tokom hronične imunske stimulacije supstratom, ali verovatno mogu i da se smanje ili izgube prirodnim tokom bolesti ili pod dejstvom terapijske intervencije. Ukoliko ovi tranzitorni klonovi prežive i perzistiraju dovoljno dugo da bi mogli da proliferišu, mogli bi da se prate kroz vreme jer neki od njih možda predstavljaju i premaligni klon. Međutim, mora se naglasiti činjenica da nijedan od ispitivanih bolesnika nije razvio multipli mijelom tokom perioda praćenja. Može se zaključiti da uprkos relativno ranoj pojavi klonalne ekspanzije u toku bolesti, barem sudeći prema *IGH* rearanžmanu, detektovani klonovi možda predstavljaju tranzitorne klonove. Pažljivo kliničko praćenje ovih bolesnika bi bilo uključujući i monitoring limfoidnih neoplazmi, a posebno multiplog mijeloma.

U studiji Alena i sar. autori su opisali povišenje nivoa IL-6 i IL-10 u bolesnika sa Gošeovom bolešću (*Allen 1997*). Kao što je već pomenuto, IL-6 predstavlja parakrini regulator rasta ćelija multiplog mijeloma, a koncentracija IL-6 je često povišena kod bolesnika sa MM (*Sipe 1995*). Pored toga, IL-6 je potentan stimulator resorpcije kosti (*Hughes 1993*) i sinteze reaktanata akutne faze u jetri (*Lowik 1989*). Sve ovo govori u prilog povezanosti ovog interleukina sa karakterističnim nalazima Gošeove bolesti: perzistencijom reaktanata akutne faze, poremećajima skeleta i imunoglobulina, kao i mogućim razvojem multiplog mijeloma. Nešto je manje jasna potencijalna uloga IL-10 u patogenezi Gošeove bolesti. Međutim, činjenica da IL-10 inhibira sekretornu aktivnost osteoblasta i mineralizaciju skeleta (*Owens 1995*), može dovesti ovaj citokin u vezu sa skeletnim lezijama u ovih bolesnika. U studiji Baraka i sar. iz 1999. godine opisano je povišenje serumske koncentracije IL-1 β , antagonista receptora za IL-1 (IL-1Ra), IL-6, TNF i solubilnog IL-2 receptora (sIL-2R) (*Barak 1999*). Autori ističu hipotezu da bi se navedeni citokini mogli dovesti u vezu sa skeletnim manifestacijama, poremećajem hemotakse neutrofila i hipergamaglobulinemijom u Gošeovoj bolesti.

Uvidom u rezultate navedenih studija, jasno je da supstratom aktivirani makrofagi u Gošeovoj bolesti proizvode različite citokine. Neki od njih imaju proinflamatorno dejstvo (IL-6, IL-8, TNF), a neki antiinflamatorno (IL-1Ra, IL-10). Balans među navedenim citokinima nije potpuno jasan, ali je očigledno da favorizuje postojanje proinflamatornog stanja prisutnog

u bolesnika, obzirom na hronično perzistiranje reaktanata akutne faze u Gošeovoj bolesti, kao što je feritin.

U ovoj studiji nije nađena veza između navedenih polimorfizama za TNF i za IL-6 u odnosu na pol, uzrast, skorovanu težinu bolesti, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana *IGH* odnosno hipergamaglobulinemije. Kod jednog od ispitivanih polimorfizama za IL-10 (*IL10* rs1800871), među bolesnicima sa C alelom, nađena je statistički značajna veća vrednost inicijalne feritinemije u odnosu na bolesnike nosioce T alela. Moguće je da navedeni haplotip utiče na koncentraciju IL-10, te time direktno snižava njegovu antiinflamatornu aktivnost ili to čini indirektno, putem uticaja ovog citokina na proinflamatorne citokine, pre svega na IL-1, IL-6, IL-12 i TNF. Međutim, u ovoj grupi ispitanika, navedeni uticaj nije bio uočen na druge parametre bolesti kao što su skor težine bolesti, vrednost hitotriozidaze, kao ni na druge ispitivane varijable. Patofiziologija hiperferitinemije u Gošeovoj bolesti još uvek nije u potpunosti rasvetljena, a predloženi su različiti mehanizmi (*Lorenz 2018*). Među navedenim mehanizmima dominiraju lizosomalna disfunkcija koja dovodi do povećanja slobodnog gvožđa i reaktivnih kiseoničkih vrsta čime se povećava eksportovanje feritina putem nezavisnim od feroportina, sa jedne strane i hronična aktivacija Goševih ćelija (M1 makrofaga) sa druge strane, što dovodi do povećane proizvodnje IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF i IFN- γ , a koji putem IRP1 i IRP2 proteina dovode do hiperferitinemije. Obzirom da većina navedenih citokina stoji pod regulatornim uticajem IL-10, može se shvatiti potencijalna uloga polimorfizama ovog citokina na stepen izraženosti feritinemije u bolesnika sa Goševom bolešću.

Takođe, poređenjem učestalosti genotipova i alela između bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika populacije u Srbiji, nije uočena statistički značajna razlika ni za jedan od navedenih polimorfizama citokinskih gena.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Predrag Rodić, Milan Lakočević, Sonja Pavlović, Teodora Karan Đurašević, Tatjana Kostić, Nada Suvajdžić Vuković, Zorica Šumarac, Milan Petakov, Dragana Janić. Immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in patients with Gaucher disease. *J Med Biochem* 37: 1–7, 2018 (DOI: 10.1515/jomb-2017-0061)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj klonalnosti B limfocita i polimorfizama gena za citokine na težinu kliničke slike i pojavu monoklonske gamapatije u bolesnika sa Goševom bolešću“ dr Predraga Rodića, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja genske ekspresije analiziranih regiona gena za teški lanac imunoglobulina u patogenezi monoklonske gamapatije u bolesnika sa Goševom bolešću i po prvi put je primenjena u bolesnika sa ovom bolešću uopšte, što doprinosi objašnjenju povezanosti ispitivanih gena i mehanizama nastanka MGUS / multiplog mijeloma. Rezultati istraživanja distribucije ispitivanih alelskih varijanti gena koji kodiraju inflamatorne citokine, doprinose proširivanju saznanja o povezanosti ispitivanih gena i težine kliničke slike Goševove bolesti i pružaju polaznu osnovu za eventualno objašnjenje nekih od fenotipskih razlika u ovih bolesnika. Po prvi put je utvrđena učestalost alelskih varijanti ispitivanih gena kod pacijenata sa ovom bolešću u Srbiji.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Predraga Rodića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.4.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Nada Suvajdžić Vuković

Prof. dr Dušan Popadić

N. sav. dr Sonja Pavlović

Mentor:

Prof. dr Dragana Janić
