

NAU NOM VE U MEDICINSKG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.05.2017. godine, broj 5940/10, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Poreme aj funkcije endotela kao uzrok nastanka tromboze kod bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom“

kandidata mr dr Nataše Stanisavljevi , zaposlenog u Klini ko bolni kom centru „Bežanijska kosa“ u Beogradu. Mentor je Prof. dr Dragomir Marisavljevi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nada Suvajdži -Vukovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Andrija Bogdanovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Violeta Dopsaj, profesor Farmaceutskog fakulteta u Beogradu

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 dr Nataše Stanisavljevi napisana je na ukupno 126 strane i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 53 tabele, 27 grafikona i 4 slike. Doktorska disertacija

sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta je to antifosfolipidni sindrom, primarni i sekundarni, i kako se ispoljava. Navedeni su detaljni kriterijumi za postavljanje dijagnoze, kako klinički tako i laboratorijski. Na adekvatan način je u potpunosti opisan pristup terapiji. Prikazan je detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za patofiziologiju nastanka tromboze u antifosfolipidnom sindromu kao i na pitanje prisustva endotelne disfunkcije. Posebno je obrađeno pitanje prisustva oksidativnog stresa i inflamacije kod bolesnika sa ovim sindromom. Pored mogućih uzroka nastanka tromboze detaljno su sagledani i dodatni faktori rizika kao i mogućnosti uvida u hiperkoagulabilno stanje.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja endotelne funkcije kliničkim testom i utvrđivanja povezanosti poremećaja funkcije endotela sa učestalosti i vrstom tromboza kod bolesnika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim antifosfolipidnim sindromom (SAFS). Takođe kao cilj rada navedeno je utvrđivanje prisustva oksidativnog stresa i inflamacije kao i njihov uticaj na promenu endotelne funkcije i nastanak tromboze.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da se radi o studiji preseka sa prospektivnim uključivanjem bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom (AFS) i kontrolne grupe koja je sprovedena u Kliničko bolničko centru „Bežanijska kosa“. Detaljno su opisani kriterijumi za uključivanje u studiju, kao i kriterijumi za isključivanje iz studije. Sagledan je prvo laboratorijski deo tj. način uzimanja krvi kao i korišćene laboratorijske metode. Određivani su sledeći parametri oksidativnog stresa: lipidni hidroperoksidi (LOOH), produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP), aktivnost paraoksonaze (PON1) i ukupne sulfhidrilne grupe (SH). Kao marker zapaljenja određen je hsCRP. Od ostalih analiza merena je koncentracija asimetričnog dimetilarginina (ADMA). Takođe je određen hemostatski potencijal preko koncentracije d-dimera i parametara endogenog trombinskog potencijala (ETP). Zatim je detaljno opisan način procene endotelne funkcije kliničkim testom. 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 uključivanja u studiju.

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 211 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Dokazana je statistički značajna razlika u procentu endotel zavisne dilatacije (FMD%) između bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom (AFS) u odnosu na kontrolnu grupu. Tako je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike ($p=0,018$) u prisustvu endotel zavisne disfunkcije ($<10\%$ FMD%) između AFS pacijenata (31,4%) i kontrolne grupe (12,5%). U okviru AFS grupe, najviše je bila zastupljenost bolesnikakategorije tipa I antifosfolipidnih antitela (aFL). Analiza pojedinačnih vrsta antitela pokazala je veću prevalencu antikardiolipinskih (aKL IgG i IgM) kao i 2GPI IgG antitela kod SAFS grupe. Registrovano je ukupno 93 trombotična događaja i to 53 u PAFS grupi (58,9%) i 40 (80%) u SAFS grupi sa približnom učestalošću u arterijskih i venskih tromboza. Pokazane su više vrednosti analiziranih markera zapaljenja, hsCRP i neutrofilno limfocitnog odnosa, kod ispitanika sa AFS u odnosu na kontrolnu grupu. Marker zapaljenja, hsCRP se izdvaja kao osetljiviji pokazatelj prisustva i drugih faktora rizika kao što su gojaznost, hipertenzija i hiperlipidemija. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između PAFS i SAFS grupe u vrednostima sledećih parametara oksidativnog stresa: uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP), aktivnosti paraoksonaze 1 (PON1) i ukupnihsulfidrilnih grupa (SH). Koncentracije LOOH i AOPP pokazuju značajne statističke korelacije prema lipidnim frakcijama za razliku od SH i PON1. U multivarijantnoj analizi potvrđeno je da su nezavisni prediktori povećane AOPP koncentracije starost ($p = 0,008$; 95%CI 1.243–8.140), gojaznost ($p= 0,012$; 95 % CI 1.068–8.657), ali i lipidne frakcije (holesterola ($p = 0,012$, 95%CI 0.589–3.223) i HDL ($p = 0,002$, 95%CI 1.841–8.453). Primenom multivarijantne analize za LOOH izdvaja se koncentracija triglicerida ($p = 0,004$; 95%CI 0.774–3.990). U AFS grupi su pokazane statistički značajno više koncentracije asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u odnosu na kontrolnu grupu, kao i kod bolesnika sa SAFS u odnosu na PAFS. Utvrđeno je postojanje značajne statističke korelacije ADMA sa hsCRP ($r = 0,190$; $p=0,025$), aKL IgG ($r = 0,208$; $p=0,033$) kao i visokim titrom 2IgG ($r = 0,193$; $p=0,049$).

U regresionoj analizi faktora rizika za endotelnu disfunkciju kod AFS bolesnika izdvaja se starost ($p=0,001$). Nijedna vrsta aFL nije pokazala da ima direktan udeo u nastanku endotelne disfunkcije. U grupi svih ispitanika (AFS i kontrolne grupe) postoji statisti ki zna ajna negativna korelacija FMD% sa koncentracijom hsCRP, LOOH, AOPP kao i sa ADMA i vrednostima d dimera. U regresionoj analizi se u svakoj grupi (PAFS i SAFS) izdvaja LOOH ($p<0,005$) kao statisti ki zna ajan parametar za nastanak endotelne disfunkcije. Nije utvr eno postojanje statisti ki zna ajne korelacije FMD% sa parametrima ETP.

U regresionoj analizi svih faktora rizika za trombozu kod AFS bolesnika izdvaja se starost ($p<0,05$). Utvr eno je da bolesnici sa pozitivnim LA imali statisti ki zna ajno eš e vensku trombozu ($p=0,021$) kao i površne tromboflebitise donjih ekstremiteta ($p=0,005$). Bolesnici sa pozitivnim aKL IgG ($p=0,037$) i β 2GPI IgM ($p=0,049$) su eš e imali arterijsku trombozu donjeg ekstremiteta, dok su bolesnici sa β 2GPI IgG ($p=0,032$) eš e imali TIA ($p=0,032$) i oni sa aKL IgG ($p=0,049$) infarkt miokarda. Pacijenti sa trojno pozitivnim aFL su statisti ki zna ajno eš e imali trombozu ($p=0,006$). Nisu na ene statisti ki zna ajne korelacije hsCRP, ADMA i PON1 sa prethodnom trombozom.

Kod bolesnika sa AFS, procenat endotel zavisne dilatacije korelira sa nastankom tromboze ($r=0,176$, $p=0,038$). Statisti kom analizom primenom ROC krive zavisnosti FMD% i prethodnog prisustva tromboza izdvaja se *cut off* vrednost od 6,85% koja ima senzitivnost od 73% i specifi nost od 45%. Iz gore navedenog se može zaklju iti i da je manje od 10% promene protoka endotel zavisne dilatacije (koja je u ovom ispitivanju bila granica za utvr ivanje prisustva endotel zavisne disfunkcije) dovoljna kao okida nastanka tromboze. Na eno je da su glavni faktori rizika za nastanak endotel zavisne disfunkcije starost, povišena koncentracija LOOH, AOPP i ADMA. U regresionom modelu izdvajaju se dva: starost ($p=0,002$) i LOOH ($p=0,028$). Obzirom da je endotel zavisna disfunkcija prethodnik tromboze, u regresionom modelu su posmatrane FMD% i starost kao varijable u nastanku tromboze, ali nijedna se nije izdvojila kao prediktor ovog doga aja. Iako nema direktnog uticaja aFL na FMD, izveden je model ROC krive potencijalnog sinergisti kog efekta endotelne disfunkcije i pojedina nih aFL u pravcu nastanka tromboze kod ispitanika sa AFS. Pokazala se statisti ki zna ajna veza sa svakim tipom aFL, ali i da je trojna aFL pozitivnost sa prisutnom endotel zavisnom disfunkcijom najja i faktor u nastanku tromboze ($p=0,001$).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U dosadašnjim istraživanjima o AFS nije dobijen odgovor na pitanje da li je tromboza primarno problem endotela, da li postoji kao stalno prisutan ili povremeni rizik ili postoje drugi faktori tipa inflamacije, uro enih stanja koji imaju uticaja na „snagu“ razli itih aFL. Pretpostavka ovog istraživanja je da kod obolelih od AFS prisustvo aFL zbog ošte enja endotela, izazvanog oksidativnim stresom i inflamacijom, može dovesti do trajne disfunkcije endotela uz pojavu trombofilnog stanja, tj. tromboza.

Opšte osobine ispitivane grupe su u skladu sa poznatim injenicama iz literature. U ovoj kohorti kod bolesnika sa AFS najve a je bila zastupljenost bolesnika kategorije I, kao i prisustva visokorizi nog profila aFL, tj. eš eg i višeg titra aKL IgM i β 2GPI IgG kod ispitanika sa SAFS. Prema literaturnim podacima, u estalosti pozitivnosti vrsta aFL u PAFS i SAFS su raznolike što se opravdava njihovom fluktuacijom tokom vremena kao i laboratorijskim metodama odre ivanja koje nisu apsolutno standardizovane (Uthmanai sar. 2008., Devreese i sar. 2012., Stojanovich i sar. 2013.). Vrednosti hsCRP su bile zna ajno više u grupi AFS (kao i SAFS u odnosu na PAFS) što odgovara podacima iz literature pa se ak vrednosti hsCRP mogu koristiti u razlikovanju PAFS i SAFS (Be arevi i sar. 2016.). Saglasno podacima iz literature (Alves i sar. 2002,2003, Ames i sar. 1999, Ionnou 2011), u ispitivanoj grupi AFS pokazano je postojanje oksidativnog poreme aja u odnosu na kontrolnu grupu i to mereno preko oksidacije proteina (AOPP) i sniženja antioksidativnih mehanizmama (PON1 i SH) pri emu su iste relacije prisutne i u odnosu SAFS prema PAFS grupi ispitanika. Nasuprot podacima iz literature gde aKL i β ₂GPIimaju udela u poreme aju oksidativnih procesa (Pratico i sar. 1999, Alves i sar. 2003), u ovom istraživanju aFL uti u na antioksidativne mehanizme dok zna ajan doprinos procesima oksidacije u smislu lipidne peroksidacije daje pozitivnost LA kod AFS ispitanika. Saglasno radu Mayer-Pickela i sar., 2016. koncentracija ADMA je bila zna ajno viša kod AFS u odnosu na kontrolnu grupu kao i kod SAFS u odnosu na PAFS. Prema podacima iz literature ETP može da bude pokazatelj kako hiper tako i hipokoagulabilnog stanja (vanHylckama i sar. 2007, Devreese i sar. 2009). U ispitivanoj grupi je pokazano da je ETP dobar pokazatelj hemostatskog potencijala kao i marker u pra enju efikasnosti oralne antikoagulantne terapije.

U ispitivanoj grupi AFS bolesnika potvr eno je postojanje disfunkcije endotela što se slaže sa podacima iz literature (Mercanoglu i sar. 2004, Stalc i sar., Mikolajczyk i sar. 2016). Analizom uticaja standardnih faktora rizika na pojedina ne grupe ispitanika (PAFS, SAFS, kontrolna grupa) hiperlipoproteinemija ima najviše uticaja na kontronu grupu (ali ne i kao

nezavisni prediktori) dok se u grupi AFS isti e starost kao nezavisni prediktor FMD%. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Shevchuk i sar. 2013, koji su dokazali da hipertrigliceridemija AFS bolesnika zna ajno korelirala sa veli inom FMD. Podaci iz literature koji se odnose na povezanost tipa i visine titra aFL na procenat FMD brahijalne arterije su vrlo oskudni (Ames i sar. 2010, Mineo i sar. 2013, Schevruk i sar. 2007) a u ovom istraživanju tip, kategorija aFL kao i visina titra aFL nisu bili u zna ajnoj korelaciji sa prisutnom endotelnom disfunkcijom. U ispitivanoj kohorti postoji statisti ki zna ajna negativna korelacija FMD% i hsCRP ali ova veza nije uo ena sa NLR kao drugog posmatranog markera zapaljenja, što je saglasno ranijim istraživanjima gde je pokazano da hsCRP inhibira sintezu NO (Verma i sar. 2002, Stalc i sar. 2011). Korak napred u ispitivanju posmatrane kohorte je i uo ena veza koncentracije ADMA i endotelne disfunkcije sa malo podataka u literaturi. Tako e, u literaturi su oskudni podaci o me usobnoj povezanosti parametara oksidativnog stresa i endotelne funkcije merene klini kim tetstom procene dilatacije a. brahialis. U ovoj kohorti, je na eno da kod svake od pojedina no ispitivanih grupa (AFS, PAFS, SAFS, kontrolna grupa), procenat endotel zavisne dilatacije pokazuje korelaciju sa markerima oksidativnih procesa (LOOH i AOPP) i to sa ja im uticajem lipidne peroksidacije koji se izdvaja kao nezavisni prediktor FMD%. U ispitivanoj grupi AFS ukupna prevalenca klini kog doga aja je bila sli na navedenim iz literature (Cervera i sar. 2002, Camps Garzia T i sar. 2004). Kao nezavisni prediktor tromboze se izdvojila starost kao faktor rizika pored klasi nih ve poznatih faktora rizika (Medina i sar. 2011, Ames i sar. 2010, Giron-Gonzalez i sar. 2004, Krnic-Barrie i sar. 1997). Obzirom na podatak iz literature da rizik za trombozu raste eksponencijalno nakon 50te godine života (Naess i sar. 2007), zaklju eno je da je granica fiziološke starosti mnogo niža za AFS bolesnike nego opštu populaciju pošto je srednja starost kohorte bila 42 godine. Povezanost aFL i tromboza u literaturi je puna kontradikcija, koje su posledica istorijskih studija kada se nisu ni testirala 2GPI, nestandardizacije protokola testiranja, neujedna ene visine titra koja se smatra pozitivnom ali i prirodnom fluktuacijom titra kod AFS pacijenata. U ovom istraživanju je zaklju eno da je svako aFL i svaki titar aFL bitan za nastanak tromboze. U opštoj populaciji, pokazano je da hsCRP ima ograni enu vrednost u predikciji venskog tromboembolizma (Ridker i sar. 1997, Tsai i sar. 2002) što je potvr eno i u ovoj ispitivanoj AFS grupi. Koncentracija ADMA nije pokazala korelacije sa prethodnom trombozom kao klini kom prezentacijom AFS. Tako e, kod pacijenata sa AFS i trombocitopenijom bilo je više tromboza, tj. paradoksalno trombocitopenija nije zaštita od tromboti nog doga aja kod AFS pacijenata. Kod pacijenata sa AFS i prethodnom trombozom prisutan je oksidativni stres u

vidu pozitivnih markera oksidacije (LOOH i AOPP). Me utim, statisti kom analizom se nijedan od ovih parametara nije izdvojio kao nezavisni prediktor tromboti nog doga aja.

Analogno podacima iz literature (Meroni i sar. 2001, Ruiz-Irastorza i sar. 2010) u ovom istraživanju je potvr eno da kod bolesnika sa AFS endotel zavisna disfunkcija korelira sa nastankom tromboze. Po preporukama iz literature (Celermajer i sar. 1992.) koriš ena je arbitrarna granica od 10% promene dilatacije brahijalne arterije kao pokazatelj disfunkcije. Me utim, u ovoj studiji je pokazano da i manje od 10%razlike u dilataciji može da bude faktor rizika za nastanak tromboze. Tako e, dobijen je nalaz da je starost zajedni ki nezavisni prediktor postojanja i endotel zavisne disfunkcije i nastanka tromboze. U rezultatima je postavljen predikcioni model za nastanak tromboze kada se posmatra sinergisti ki efekat FMD% i pojedina ne vrste aFL. Pokazan je njihov sinergisti ki efekat na endotel u pravcu nastanka tromboze kod ispitanika sa AFS ali i da je trojna aFL pozitivnost sa prisutnom endotel zavisnom disfunkcijom najja i faktor u nastanku tromboze.

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

1. **Stanisavljevic N**, Stojanovich L, Marisavljevic D, Djokovic A, Dopsaj V, Kotur-Stevuljevic J, Martinovic J, Memon L, Radovanovic S, Todic B, Lisulov D. Lipid peroxidation as risk factor for endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome patients. Clin Rheumatol 2016;35(10):2485-93.

2. Djokovic A, Stojanovich L, Kontic M, **Stanisavljevic N**, Radovanovic S, Marisavljevic D. Association between cardiac manifestations and antiphospholipid antibody type and level in a cohort of Serbian patients with primary and secondary antiphospholipid syndrome. Isr Med Assoc J 2014;16(3):162-7.

3. Djokovic A, Stojanovich Lj, **Stanisavljevic N**, Bisenic V, Radovanovic S, Soldatovic I, Simic DV. Does the presence of secondary antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematoses accelerate carotid arteries intima-media thickness changes? Rheumatol Int 2014;34(3):321-7.

4. Stojanovich L, Kontic M, Djokovic A, Marisavljevic D, Ilijevski N, **Stanisavljevic N**, Mikovic Z, Petkovic M, Kovcin V. Association between systemic non-criteria APS manifestations and antibody type and level: results from the Serbian national cohort study. Clin Exp Rheumatol 2013;31(2):234-42.
5. Stojanovich L, Markovic O, Marisavljevic D, Elezovic I, Ilijevski N, **Stanisavljevic N**. Influence of antiphospholipid antibody levels and type on thrombotic manifestations: results from the Serbian National Cohort Study. Lupus 2012;21(3):338-45.
6. Stojanovich L, Kontic M, Djokovic A, Ilijevski N, **Stanisavljevic N**, Marisavljevic D. Pulmonary events in antiphospholipid syndrome: influence of antiphospholipid antibody type and levels. Scand J Rheumatol 2012;41(3):223-6.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Poremećaj funkcije endotela kao uzrok nastanka tromboze kod bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom“ dr Nataše Stanisavljević, kao prvi ovakav rad u našoj medicinskoj publicistici predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja pre svega endotelne funkcije u nastanku tromboze kod bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom, ali i doprinos faktora rizika tipa klasičnih kardiovaskularnih faktora, inflamacije i poremećaja oksidativne ravnoteže kliničkoj prezentaciji AFS. Prvi korak jesu promene na endotelu pod uticajem starenja i uticaj tinjajućeg zapaljenja u AFS (koja znatno dobija na značajnosti kod AFS pošto je inflamacija jače izražena). Dodatni faktori jesu standardni faktori rizika tipa hiperlipoproteinemije i komorbiditeta tipa gojaznosti i hipertenzije koje su podjednako značajne i za nastanak disfunkcije endotela i za nastanak tromboze. Takođe, pomereni balans oksidativnih procesa ka većjoj oksidaciji i manjoj aktivnosti antioksidativnih procesa je aktivan učilac i u nastanku disfunkcije endotela i tromboze. Antifosfolipidna antitela, bilo koje vrste ili titra, učestvuju direktno ili indirektno u procesima disfunkcije endotela kao i nastanka tromboze. Bolesnici sa AFS zahtevaju sveobuhvatnu evaluaciju funkcije endotela, agresivnu redukciju postojećih faktora rizika i redovno praćenje radi sprežavanja recidiva tromboze koja je glavni uzrok mortaliteta bolesnika sa AFS.

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 veće u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Nataše Stanisavljević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 13.09.2017.

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Nada Suvajdžić -Vuković Prof. Dr Dragomir Marisavljević

Prof. dr Andrija Bogdanović Komentor:

Naučni Savetnik dr Ljudmila Stojanović

Prof. dr Violeta Dopsaj
