

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća od 09. novembra 2017. godine, broj 5940/13, određena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata mr sci. med. dr Radovana Mijanovića, pod nazivom

„Ispitivanje kliničkih, imunoseroloških, imunofenotipskih i citokinskih profila pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom“

Mentor doktorske disertacije je **prof. dr Branka Bonači-Nikolić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Za članove Komisije za ocenu završene doktorske disertacije određeni su:

1. **Prof.dr Ljudmila Nagorni-Obradović**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Prof.dr Andrija Bogdanović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **Prof.dr Vladimir Jurišić**, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

Članovi Komisije su detaljno proučili priloženu disertaciju i podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Radovana Mijanovića, pod nazivom „**Ispitivanje kliničkih, imunoseroloških, imunofenotipskih i citokinskih profila pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom**“ napisana je na 110 strana, sadrži 12 grafikona i 37 tabela. Doktorska disertacija je podeljena na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Literatura. Doktorska disertacija sadrži

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

Uvod sadrži 9 potpoglavlja koja su napisana jasno i koncizno. Prikazani su definicija i dijagnoza česte varijabilne imunodeficijencije (CVID), kratak istorijat primarnih imunodeficijencija (PID), kao i epidemiologija CVID i PID. Na pregledan način su dati detalji koji se odnose na postojeće probleme u dijagnozi CVID. Zatim je prikazana detaljna patogeneza CVID sa osvrtom na poremećaje u citokinima, urođenom imunskom sistemu, kao i u B i T ćelijama. Dat je prikaz novih klasifikacija (Euroklas i Đovaneti) na osnovu procenta ćelija B perifernog ćelijskog pula i naivnih T limfocita. Poseban akcenat je stavljen na kompleksnu kliničku sliku CVID-a sa prikazom najčešćih manifestacija ove bolesti. Dat je koncizan prikaz lečenja i prognoze bolesnika sa CVID, kao i kratak prikaz druge PID – X vezane agamaglobulinemije (XAG). Bolesnici sa XAG su korišćeni kao kontrolna grupa u ovom ispitivanju.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani u 5 celina: 1. Ispitati demografske, kliničke i imunoserološke parametre kod pacijenata sa CVID 2. Analizirati imunofenotip limfocita periferne krvi pacijenata sa CVID 3. Utvrditi klinički značaj citokinskog, imunofenotipskog i imunoserološkog profila kod pacijenata sa CVID 4. Ispitati korelaciju između dobijenih demografskih, kliničkih, imunoseroloških, citokinskih i imunofenotipskih parametara 5. Utvrditi smrtnost bolesnika kod pojedinih kliničkih fenotipova, petogodišnje i dugoročno preživljavanje, kao i uticaj određenih demografskih, kliničkih, imunoseroloških, imunofenotipskih i citokinskih parametara na ishod bolesti.

Poglavlje **pacijenti i metode** sadrži tri dela: ispitanici i dizajn studije, laboratorijske analize i statistička analiza. Ispitivanje je sprovedeno u vidu kohortne studije, koja je obuhvatila 51 pacijenta, koji su se lečili od CVID na Klinici za alergologiju i imunologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 1.1.1998. do 31.12.2016. Svim pacijentima su tokom lečenja registrovane komplikacije, inicijalne koncentracije imunoglobulina G, A, M, kao i ishod bolesti. Pacijenti su podeljeni u grupe, odnosno kliničke fenotipove, prema prisutnosti komplikacija na različitim organima: 1. plućne bolesti; 2. limfoproliferacija; 3. gastrointestinalne bolesti; 4. autoimunske bolesti. Kod 40 pacijenata je rađena prospektivna studija koja je obuhvatila sledeća ispitivanja: određivanje standardnog i proširenog T i B ćelijskog imunofenotipa (FACS), spirometriju, određivanje difuzijskog kapaciteta pluća za ugljen monoksid, ultrazvuk trbuha, radiografija srca i pluća, određivanje koncentracija

citokina BAFF i IL-10 (ELISA), β 2 mikroglobulina i rađena je PPD (3J) intradermalna kožna proba. Dodatna dijagnostika je rađena prema potrebi i prisutnosti tegoba pacijenata. Studija je izvedena u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije i odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključanja u studiju. Kontrolnu grupu je činio 21 zdrav ispitanik mečovanih po polu i uzrastu sa pacijentima.

Za obradu rezultata korišćene su sledeće statističke metode: medijana, procenti, interkvartilni rangovi, Man-Vitnijev (Mann-Whitney) test, neparametrijska jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), Kruskal-Wallisov (Kruskal-Wallis) test, hi kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće, Spirmanov koeficijent korelacije (Spearman's correlation coefficient). Krivulja verovatnoće preživljavanja predstavljena je metodom Kaplan-Majer (Kaplan-Meier), a poređenje vremena preživljavanja različitih grupa bolesnika vršeno je Log-rank testom. Statistička značajnost definisana je na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $p < 0.05$ do $p < 0.01$. Svi podaci su obrađeni u SPSS 20.0 (IBM softverskom paketu).

U poglavlju **rezultati**, detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Rezultati su podeljeni u 6 velikih grupa od kojih svaka grupa ima 1-12 podgrupa.

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

Zaključci u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, a na osnovu dobijenih rezultata, su podeljeni u 6 grupa, od kojih svaka grupa zaključaka ima 3-6 celina. Generalno, studija je pokazala kliničku heterogenost pacijenata sa CVID kao i značaj određivanja kliničkog, imunoserološkog, imunofenotipskog i citokinskog profila u ranoj dijagnozi i prognozi bolesti. Analiza dobijenih rezultata ukazuje na složenu disregulaciju imunskog odgovora kod CVID. Adekvatno praćenje i lečenje su od primarnog značaja u smanjenju brojnih komplikacija i stope mortaliteta pacijenata.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 168 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Srednja životna dob pri postavljanju dijagnoze bolesnika sa CVID je iznosila 33 godine, dok je srednje kašnjenje u postavljanju dijagnoze 6 godina. Od CVID obolevaju sa

istom učestalosti žene i muškarci, ali su žene statistički starije ($p < 0,05$). Najčešći klinički fenotip bile su hronične plućne bolesti sa 72,54%, dok je limfoproliferaciju imalo 56,86%, gastrointestinalne bolesti 50,98% i autoimunske bolesti 33,33% bolesnika. 66,7% pacijenata ima preklapanje dva ili više klinička fenotipa.

Nije bilo značajnih statističkih razlika između kliničkih fenotipova po kliničkim, imunoserološkim, imunofenotipskim i citokinskim parametrima. Bolesnici sa CVID su imali značajno lošiju plućnu funkciju (snižen FEV1, VC, FEV1/FVC) u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0,05$). Većina bolesnika sa CVID su imali negativnu tuberkulinsku PPD (3J) kožnu probu.

U ispitivanju imunofenotipizacije perifernih leukocita, bolesnici sa CVID u odnosu na zdrave kontrole su imali značajno manji broj CD3+, CD4+, CD3-CD16+/56+, CD19+ limfocita i značajno manji CD4/CD8 odnos ($p < 0,01$). Analiza proširenog imunofenotipa je pokazala da bolesnici sa CVID u odnosu na zdrave kontrole imaju značajno veći procenat B ćelija sličnim ćelijama marginalne zone, tranzicionih i aktiviranih limfocita, kao i manji procenat memorijskih B ćelija sa promenjenom klasom, plazmablasta i plazmablasta sa promenjenom klasom ($p < 0,05$). Limfoproliferacija se značajno češće javljala u smB-Trⁿ i smB-21ⁿ Euroklas grupama ($p < 0,05$). Bolesnici sa CVID su imali značajno više koncentracije BAFF, IL-10 i $\beta 2$ mikroglobulina u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0,05$).

Analiza parametara grupa bolesnika koji su pripadali jednom kliničkom fenotipu u odnosu na bolesnike bez tog fenotipa je pokazala sledeće: bolesnici sa plućnim bolestima su imali značajno manji broj CD4+, CD19+ i tranzicionih limfocita ($p < 0,05$). Bolesnici sa limfoproliferacijama su imali značajno viši FEV1, DLCO i nivo $\beta 2$ mikroglobulina u krvi ($p < 0,05$). Bolesnici sa gastrointestinalnim bolestima su imali značajno veću koncentraciju BAFF u krvi i manji procenat naivnih B ćelija ($p < 0,05$). Bolesnici sa autoimunske bolesti su imali značajno viši nivo inicijalnog imunoglobulina (Ig)A, nižu koncentraciju IL-10, manji procenat naivnih B ćelija, kao i značajno veći procenat B ćelija sličnim ćelijama marginalne zone i aktiviranih limfocita ($p < 0,05$). Takođe je nađena pozitivna korelacija između početka bolesti i vrednosti FEV1, VC i DLCO koja ukazuje na progresivno oštećenje plućne funkcije ($p < 0,05$), dok negativna korelacija između broja B limfocita i nivoa BAFF u krvi ukazuje da je broj B limfocita glavni regulator nivoa BAFF u krvi ($p < 0,01$). Pozitivna korelacija između nivoa BAFF i procenta aktiviranih B limfocita ($p < 0,05$) ukazuje na značaj BAFF u indukciji autoimunskih fenomena.

Smrtnost bolesnika tokom 18-godišnjeg praćenja iznosi 25,5%. Petogodišnje preživljavanje iznosi 91,43%. Bolesnici sa gastrointestinalnim i autoimunskim bolestima su imali najveću smrtnost, nižu stopu petogodišnjeg, kao i dugoročnog preživljavanja. Parametri povezani sa lošijom prognozom su: kašnjenje u postavljanju dijagnoze, povišena koncentracija IgM u krvi na početku bolesti, redukcija CD4+, CD19+ i tranzicionih limfocita, uz ekspanziju aktiviranih limfocita, povišen nivo BAFF u krvi, oštećena plućna funkcija (nizak FEV1 i VC) i postojanje preklapanja sva četiri klinička fenotipa.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova studija je prva studija u jugoistočnoj Evropi koja se bavila analizom demografskih, kliničkih, imunoseroloških, imunofenotipskih i citokinskih karakteristika adultnih bolesnika sa CVID. Učestalost i distribucija kliničkih fenotipova, njihovih preklapanja, inicijalnih koncentracija Ig-a, infekcija koje su prethodili bolesti, kao i njihovih najčešćih prouzrokovaca su u skladu sa velikim internacionalnim studijama, koje su pokazale veliku heterogenost ove bolesti (Mouillot G i sar., 2010; Bateman EA i sar., 2012; Gathmann B i sar., 2014).

U daljem toku ispitivanja, određivana je disajna funkcija svih obolelih i zdravih kontrola. Dosadašnje studije su pokazale značajno sniženje spirometrijskih parametara obolelih od CVID, koje je potvrđeno i kod naših bolesnika (Touw CM i sar., 2010; Agondi RC i sar., 2010; Kainulainen L i sar., 1999). Određivanje PPD kožne probe, kao jedan od načina određivanja celularnog imuniteta, je pokazalo da bolesnici sa CVID i XAG imaju u velikoj većini odsutan odgovor na kožnu probu. Još u ranijim studijama je pokazano da pacijenti sa CVID-om imaju varijabilne defekte u celularnom imunitetu, naročito u vidu odsutnosti kožnih odgovora na primarne i ubikvitarne antigene (Stagg AJ i sar., 1994), dok je u nekim studijama 30% pacijenata su imali defekt u mitogenskom odgovoru (North ME i sar., 1989).

Dosada su rađena brojna ispitivanja različitih citokina kod bolesnika sa CVID i dobijeni su često različiti rezultati. Jedan od razloga je sama tehnika ispitivanja. produkcije citokina sa ili bez stimulacije (Varzaneh FN i sar., 2014). U dosadašnjim studijama je nađeno da su pacijenti sa CVID i XAG imali povišene vrednosti BAFF u krvi u odnosu na zdrave ispitanike i nije nađena značajna razlika u koncentracijama između različitih kliničkih fenotipova ((Knight AK i sar., 2007; Kreuzaler M i sar., 2012). Ispitivanje nivoa IL-10 kod

obolelih od CVID je pokazalo značajne varijacije (Varzaneh FN i sar., 2014), koje su uglavnom zavisile od tehnike ispitivanja. Određivanje koncentracija $\beta 2$ mikroglobulina je rađeno u samo nekoliko studija, gde oboleli od CVID imaju značajno više nivoe od zdravih ispitanika (North ME i sar., 1991; Chapel H i sar., 2012).

Dosadašnja ispitivanja osnovnog imunofenotipa T, B i NK ćelija u CVID-u su pokazala značajne poremećaje. U većini studija bolesnici sa CVID su imali značajno sniženje broja CD3+, CD19+, CD4+ i NK limfocita u odnosu na zdrave kontrole (Arumugakani G i sar. iz 2010; Mouillot G i sar., 2010; Bateman EA i sar., 2012). Broj CD8+ limfocita je u dosadašnjim ispitivanjima pokazivao varijabilnost. U nekim studijama nije nađena razlika između obolelih i zdravih ispitanika, kao i u našoj (Arumugakani G i sar. iz 2010; Mouillot G i sar., 2010), dok je u drugim navedeno da je nađeno sniženje kod bolesnika sa autoimunskim bolestima (Bateman EA i sar., 2012; Brent J i sar., 2016).

U ispitivanju proširenog imunofenotipa B i T ćelija kod pacijenata sa CVID-om su vršena brojna ispitivanja, ali su ispitivani različiti klinički fenotipovi i entiteti, kao i različiti tipovi ćelija. U dosadašnjim ispitivanjima je nađeno značajno sniženje memorijskih ćelija sa promenjenom klasom i plazmablasta, dok je registrovano povećanje aktiviranih limfocita. Rezultati u procentu tranzicionih i limfocita sličnim ćelijama marginalne zone se razlikuju u različitim studijama. Još veća varijabilnost je navedena kod različitih kliničkih fenotipova u okviru Euroklas klasifikacije (Wehr C i sar., 2008; Al Kindi M i sar., 2012; Mouillot G i sar., 2010). U ispitivanju naivnih T limfocita u literaturi je zabeležena povezanost njihovog niskog procenta sa različitim kliničkim fenotipovima, mada najčešće kod bolesnika sa limfoproliferacijama (Giovannetti A i sar., 2007; Bateman EA i sar., 2012).

U dosadašnjim ispitivanjima smrtnosti kod obolelih od CVID je smanjena sa 27-30% iz 1990-ih na 15% tokom 20 godina praćenja u novijim studijama (Hermaszewski RA i Webster AD, 1993; Cunningham-Rundles C, 2010). U dosadašnjim ispitivanjima nađeni su brojni faktori udruženi sa većim rizikom mortaliteta, najčešće nizak broj CD19+ limfocita (Cunningham-Rundles C i Bodian C, 1999; Resnick E i sar., 2012).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u časopisima indeksiranom u Current Contents-u (CC) i Science Citation Index-u (SCI):

1. Mijanovic R, Andrejevic S, Jurisic V, Bonaci-Nikolic B. Serum B cell activating factor and interleukin 10 levels in common variable immunodeficiency: relationship with clinical findings. Vojnosanit Pregl. 2017; „Article in Press“. M 23; IF 0,367 za 2016 DOI: 10.2298/VSP161115068M
2. Perovic D, Perovic V, Pravica V, Bonaci-Nikolic B, Mijanovic R, Bunjevacki V. Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study. Immunol Lett. 2016;176:97-104. M22; IF 2.483

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija pod nazivom „**Ispitivanje kliničkih, imunoseroloških, imunofenotipskih i citokinskih profila pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom**“ dr Radovana Mijanovića, je aktuelna i značajna tema u okviru ispitivanja primarnih imunodeficijenција. Ovo je prva doktorska disertacija na Medicinskom fakultetu u Beogradu koja analizira CVID i predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju ove retke bolesti. Prvi put je procenjena učestalost pojedinih kliničkih fenotipova CVID, kao i njihove demografske, imunofenotipske i citokinske specifičnosti, čime će biti omogućeno njihovo efikasnije i ranije dijagnostikovanje i lečenje. Rad je ukazao na značaj ispitivanja proširenog imunofenotipa limfocita periferne krvi primenom protočne citometrije i određivanju određenih serumskih citokina u ranoj dijagnozi, lečenju i prognozi bolesti.

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 u poređenju sa savremenom literaturom, a na osnovu rezultata izvedeni su odgovarajući zaključci.

Na osnovu navedenih podataka, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati disertaciju mr sci. med. dr Radovana Mijanovića pod naslovom **„Ispitivanje kliničkih, imunoseroloških, imunofenotipskih i citokinskih profila pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom“** i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 24. novembar 2017. godine

Članovi komisije:

Mentor: Prof. dr Branka Bonači- Nikolić

Prof. dr Ljudmila Nagorni-Obradović

Prof. dr Andrija Bogdanović

Prof. dr Vladimir Jurišić