

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 3.11.2014. godine, određena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Danijele Miković pod nazivom: „*Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A*“. Mentor za izradu doktorske disertacije je Prof. dr Ivo Elezović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, a komentor doc. dr Jovan Antović, Univerzitetška bolnica i institut Karolinska Univerziteta u Stokholmu

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr Dragana Janić Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof.dr Nada Suvajdžić-Vuković Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Dr sc. NS Dragica Radojković Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija mr sc. dr Danijele Miković „*Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A*“ napisana je na 126 strana i sastoji se od sedam poglavlja i priloga u vidu 39 tabela, 14 grafikona i 7 slika. Podeljena je na poglavlja: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. Disertacija sadrži podatke o komisiji, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, listu skraćenica korišćenih u tekstu

kao i biografiju kandidata. Citirano ju 165 reference iz doma e i strane literature. Struktura i kompozicija rada u celini sadrže sve elemente i zadovoljavaju sve kriterijume doktorske disertacije.

UVOD – Ovo poglavlje sastoji se iz tri celine: a) Hemostaza, b) Hemofilija i c) Testovi za ispitivanje hemostaze. U delu Uvoda „Hemostaza“ prikazana je uloga krvnih sudova i trombocita u procesu hemostaze i detaljno je opisan koncept procesa koagulacije i fibrinolize sa dosadašnjim nau nim saznanjima vezanim za delovanje trombina i trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFI). U slede em odeljku Uvoda „Hemofilija“ prikazana je etiologija, nasle ivanje, patofiziologija, klini ka slika, dijagnoza i terapija hemofilije. Izneta su i dosadašnja nau na saznanja, sa posebnim osvrtom na procenu težine klini ke slike, procenu odgovora na terapiju i uticaj faktora trombofilije u hemofilji. U tre em odeljku Uvoda – „Testovi za ispitivanje poreme aja hemostaze“ prikazani su skrining i specijalni testovi hemostaze kao i dosadašnja nau na saznanja o primeni testova za merenje TAFI i testova globalne hemostaze.

CILJ RADA – Kod bolesnika sa hemofilijom A koji imaju isti nivo FVIII opisana je varijabilnost u težini klini ke slike i odgovora na terapiju. Mehanizam koji je u osnovi ove varijabilnosti nije razjašnjen, ali se smatra da mogu uticati brojni faktori kompleksnog sistema hemostaze. Testovi za odre ivanje aktivnosti FVIII nisu uvek i u potpunosti pozdani za procenu težine krvarenja i odgovora na terapiju i zato se ispituje uloga testova globalne hemostaze za ovu namenu. Imaju i ove injenice u vidu, kandidat je u ovom poglavlju jasno i precizno postavio ciljeve. Prvi cilj je bio da se proceni korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i nivoa aktivnosti FVIII kod bolesnika sa hemofilijom A. Drugi cilj je bio da se utvrdi zna aj ukupnog hemostatskog potencijala u proceni sklonosti i težine krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A. Tre i cilj je bio da se ispita zna aj ukupnog hemostatskog potencijala u proceni odgovora na terapiju. Kao etvrti cilj navedeno ispitivanje faktora trombofilije i uticaj na ukupni hemostatski potencijal kod bolesnika sa hemofilijom A, a kao peti cilj ispitivanje uticaja faktora trombofilije na sklonost i težinu krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A. Šesti cil je bio da se ispita aktivnost TAFI kod bolesnika sa hemofiljom A, a poslednja dva cilja su se odnosila na ispitivanje zna aja fibrinolize zavisne od TAFI u proceni sklonosti i težine krvarenja kod bolesnika sa hemofilijom A odnosno u pra enju odgovora na terapiju.

MATERIJAL I METODE – U ovom poglavlju jasno je definisan uzorak ispitanika i kontrolna grupa, detaljno je prikazan protokol ispitivanja, na in formiranja ispitivanih grupa i njihove karakteristike. U istraživanje je uključeno 76 bolesnika sa hemofilijom A, 75 muškog pola i jedna osoba ženskog pola i 30 zdravih muškaraca koji su činili kontrolnu grupu. U odnosu na stepen deficita FVIII:C bolesnici su podeljeni u grupe sa teškim (<1 IJ/dl), umerenim (1-5 IJ/dl) i blagim (>5-<40 IJ/dl) oblikom hemofilije A. Na osnovu uestalosti spontanijih krvarenja u zglobove bolesnici su podeljeni na grupu sa klinički teškim (>3 hemartroze godišnje) i klinički blagim (<3 hemartroze godišnje) oblikom bolesti. Kod 38 bolesnika sa hemofilijom A ispitivanje je izvršeno posle primene koncentrata FVIII u dozi od 1000-2000 IJ za zaustavljanje krvarenja u zglob. Laboratorijska ispitivanja su vršena na Odeljenju za ispitivanje poremećaja hemostaze u Institutu za transfuziju krvi Srbije, na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu kao i na Odeljenju za kliničku hemiju Univerzitetske bolnice Karolinska u Stokholmu.

Uzorci krvi su uzimani najmanje 48 sati posle primene poslednje doze koncentrata FVIII, a za procenu odgovora na terapiju 30 minuta posle terapije.

U uzorku krvi uzetom pre terapije ispitana je aktivnost FVIII, ukupni hemostatski potencijal, koncentracija proenzima TAFI i stepen aktivacije TAFI na osnovu koncentracije kompleksa aktivne i inaktivirane forme TAFIa/TAFIai. Ispitana je aktivnost faktora koagulacije i prisustvo faktora trombofilije.

U uzorku uzetom posle terapije ispitane su vrednosti FVIII:C, TAFI, TAFIa/TAFIai i UHP i upoređene su sa odgovarajućim vrednostima pre terapije koncentratom FVIII.

Statističke metode su detaljno i jasno navedene u odeljku “Statistička obrada”.

REZULTATI – Rezultati su detaljno, pregledno i sistematično prikazani na 35 strana, u 7 podpoglavljaja, 38 tabela i 14 grafikona. Najpre su prikazane deskriptivne karakteristike ispitivanih grupa u odnosu na stepen deficita FVIII:C i težinu kliničkih manifestacija. Zatim sledi prikaz značajnosti razlike ispitivanih testova hemostaze, FVIII:C i UHP, u odnosu laboratorijski i klinički težinu hemofilije A kao i u odnosu na primenjenu terapiju. Prikazana je uestalost faktora trombofilije, kao i uticaj faktora trombofilije na ukupni hemostatski potencijal i klinički težinu hemofilije A. Završni odeljci rezultata prikazuju

vrednosti proenzima TAFI i vrednosti aktivirane forme TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A kao i značaj fibrinolize zavisne od TAFI u proceni težine kliničke slike i odgovora na terapiju kod hemofilije A.

DISKUSIJA – U ovom poglavlju je jasno i pregledno prikazano poređenje rezultata istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u vodećim međunarodnim naučnim časopisima. Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa prethodnim studijama, ali i značajno proširuju dosadašnja saznanja o značaju određivanja globalnih testova hemostaze kao i uloge fibrinolize zavisne od TAFI u proceni težine krvarenja i odgovora na terapiju u hemofiliji A.

ZAKLJUČAK – Na osnovu rezultata istraživanja, kandidat je sažeto i jasno naveo zaključke koji su proistekli iz rezultata rada i iz kojih se vidi da su ostvareni postavljeni ciljevi.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati studije su pokazali da su vrednosti UHP bile značajno različite između u grupa bolesnika sa teškom, umerenom i blagom hemofilijom A. Pokazana je direktna korelacija vrednosti FVIII:C i UHP. Vrednosti UHP su bile značajno niže u klinički teškom obliku hemofilije A u odnosu na klinički blagi oblik.

Posle terapije izmerene su značajno veće vrednosti FVIII:C i UHP u odnosu na vrednosti pre terapije. Utvrđena je značajna korelacija doze koncentrata FVIII i nivoa FVIII:C posle terapije ali nema korelacije doze i vrednosti UHP posle terapije. Varijabilnost u terapijskom odgovoru između u bolesnika koji su primili istu dozu leka je posledica individualnih razlika u farmakokinetici koncentrata i različitog uticaja primenjenog leka na globalni hemostatski status.

Nema razlike u uсталosti faktora trombofilije između u grupe bolesnika sa hemofilijom A i kontrolne grupe. Vrednosti UHP u grupi bolesnika sa hemofilijom A nisu bile značajno različite u odnosu na prisustvo trombofilije. Nije pokazana značajna razlika u uсталosti faktora trombofilije u odnosu na kliničku težinu bolesti.

Fibrinoliza i fibrinoliza zavisna od TAFI su ubrzane u hemofiliji A. Vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai su bile značajno veće u grupi bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kontrolnu grupu, ali nema značajne razlike u odnosu na kliničku težinu hemofilije A. Primena terapije popravlja fibrinolizu i fibrinolizu zavisnu od TAFI. Nema značajne razlike vrednosti TAFI pre i

posle terapije, dok su vrednosti TAFIa/TAFIai bile značajno veće posle terapije što ukazuje na povećanu aktivaciju TAFI. Step en poboljšanja fibrinolize i aktivacije TAFI ne zavise od doze koncentrata ali zavise od vrednosti FVIII:C i UHP posle terapije. Nije prisutna korelacija vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai sa težinom kliničke slike i odgovorom na terapiju .

Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Rezultati kandidata su detaljno upoređeni sa podacima iz literature. Vrednosti UHP su bile značajno različite između bolesnika sa različitim težinom hemofilije A klasifikovanih na osnovu laboratorijskog ili kliničkog kriterijuma težine oboljenja. Takođe, pokazana je statistički značajna direktna korelacija vrednosti FVIII:C i UHP u našoj grupi ispitanika. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima publikovanih studija (Beltran-Miranda i sar. 2005, van Veen i sar. 2009, Antovic i sar. 2012).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je prisutna varijabilnost vrednosti UHP u terapijskom odgovoru između bolesnika, čak i kada su primili istu dozu koncentrata FVIII. Ovi podaci su u saglasnosti sa studijama koje su publikovane od strane Lewisa i sar. 2007 i Bassusa i sar. 2009. Doprinos ove studije je u potvrđivanju uloge testa UHP u proceni različitog uticaja primenjenog leka na globalni hemostatski status što potvrđuje značaj primene testova globalne hemostaze u proceni odgovora na terapiju.

Uestalost faktora trombofilije nije značajno različita između grupe bolesnika sa hemofilijom A i kontrolne grupe kao i kod bolesnika sa hemofilijom A u odnosu na kliničku težinu bolesti. Naši rezultati se ne razlikuju od prethodno objavljenih rezultata u ustalosti trombofilnih mutacija kod bolesnika sa hemofilijom A (Araújo i sar. 2003, Di Perna i sar. 2011) mada rezultati nekih studija ukazuju da prisustvo trombofilije može ublažiti kliničku sliku hemofilije A (Nowak-Gottl i sar. 2003, Kurnik i sar. 2007).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da aktivnost TAFI ne omogućava procenu kliničke težine hemofilije A, što je u skladu sa studijom Mosniera i sar. 2001, dok rezultati studije Foley i sar. 2013. ukazuju da merenje aktivacije TAFI može doprineti proceni težine kliničkih manifestacija kod bolesnika sa hemofilijom A. Doprinos ove studije je u proceni stepena aktivacije TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A posle primene terapije koncentratom FVIII. Rezultati ukazuju da iako povećanje aktivacije TAFI posle terapije doprinosi normalizaciji

ukupne fibrinolize i efikasnosti terapijskog odgovora kod bolesnika sa hemofilijom A vrednosti TAFI i TAFIa/TAFIai se ne mogu koristiti kao prediktori terapijskog odgovora. Tako e, pokazan je razli it stepen aktivacije TAFI kod bolesnika sa hemofilijom A koji primaju terapiju za zaustavljanje krvarenja u zglob u odnosu na one na profilakti koj terapiji. Ovakva istraživanja nisu do sada objavljena u stru noj literaturi i nema publikovanih podataka sa kojima bi se rezultati ovog istraživanja mogli porediti.

C. Objavljen rad koji ini deo doktorske disertacije

Mikovic D, Woodhams BJ, Holmstrom M, Elezovic I, Antovic A, Mobarrez F, et al. On-demand but not prophylactic treatment with FVIII concentrate increase thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation in severe haemophilia A patients. *Int J Lab Hem.* 2012; 34(1):35-40.

D. Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa disertacije)

Na osnovu analize priložene disertacije članovi Komisije smatraju da doktorska disertacija: „*Korelacija ukupnog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A*“ kandidata dr Danijele Mikovi u potpunosti ispunjava zakonom i Statutom Medicinskog fakulteta predvi ene uslove u pogledu obima i nau nog zna aja dobijenih rezultata. Ova disertacija predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju mehanizama koji u estvuju u patogenezi krvarenja i odgovoru na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A.

Tema doktorske disertacije je aktuelna i ima nau ni ali i prakti ni zna aj. Ova disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim nau nim pristupom i savremenom metodologijom rada. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i adekvatno diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaključci. Rad je napisan korektnim stilom, a upotreba termina i stranih re i i izraza je odgovaraju a.

Ova doktorska disertacija predstavljaju originalni nau ni doprinos u oblasti hematologije, odnosno hemofilije, jer prikazuju zna aj primene testa UHP u proceni težine krvarenja i odgovora na terapiju kod bolesnika sa hemofilijom A što omogu ava

procenu individualnih razlika u težini kliničke slike kao i individualni pristup u izboru optimalnog oblika lečenja kod bolesnika sa hemofilijom A. Rezultati disertacije na osnovu daljega istraživanja vezana za utvrđivanje značajke fibrinolize i fibrinolize zavisne od TAFI u patogenezi krvarenja i terapijskom odgovoru.

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

U Beogradu, 18.11.2014. godine

MENTOR

Prof. dr Ivo Elezović

KOMENTOR

Doc. dr Jovan Antović

ČLANOVI KOMISIJE

1. Prof.dr Dragana Janić

2. Prof dr Nada Suvajdžić Vuković

3. Dr sc. NS Dragica Radojković