

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

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

**"Analiza klini kih i imunoseroloških osobnosti bolesnika sa krioglobulinemijom: doprinos utvrđivanju fenotipova"**

kandidata dr Snežane Arandjelovi , zapolsenoj na Klinici za alergologiju i imunologiju Klini kog centra Srbije. Mentor je Prof. dr Branka Bona i Nikoli ,

komentor Ass dr sc med Sladjana Andrejevi , VNS

Komisija za ocenu završne doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Sanvila Raškovi , redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prod. dr Miodrag oli , akademik, emeritus
3. Doc.dr Mirjana Šefik Bukilica, docent Medicinskog 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 doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Snežane Arandjelovi napisana je na ukupno 198 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji ima ukupno 98 tabela, 10 grafikona i 14 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisi i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** su detaljno opisane definicija i klasifikacija krioglobulinemije, povezanost sa različitim etiološkim faktorima, zatim mehanizmi nastanka i precipitacije krioglobulina uz isticanje značajne uloge virusa hepatitisa C, reumatoidnog faktora, komplementa i citokina BlyS. Objasnjeno je patogenetski značaj krioglobulinemije, kao i kliničke manifestacije vezane za njihov prisustvo i osobine. Dati su klasifikacioni kriterijumi za postojanje krioglobulinemijskog vaskulitisa, uz objašnjenje dijagnostičkog postupka, moguća evolucija krioglobulinemijskog vaskulitisa, kao i principi liječenja.

**Ciljevi rada** su jasno definisani. Sastoje se od ispitivanja kliničkih i imunoseroloških karakteristika bolesnika sa krioglobulinemijom u zavisnosti od etiologije i težine kliničke slike, ispitivanja uticaja količine i sastava krioglobulina na kliničku prezentaciju i evoluciju bolesti, kao i ispitivanja uticaja koncentracije C3 i C4, anti C1q antitela i BlyS u serumu na aktivnost, praćenje i prognozu pojedinih formi krioglobulinemije sa i bez manifestnog vaskulitisa.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da se radi o kohortnoj studiji, koja je započeta 2006. godine na Klinici za alergologiju Kliničkog centra Srbije i trajala do 2016. godine. Detaljno je opisan izbor bolesnika, obrazloženi inkluzioni i ekskluzivni kriterijumi, kao i kliničke i serološke karakteristike koje su sakupljane u formi protokola. Opisana je podjela u grupe u odnosu na prisustvo i težinu krioglobulinemijskog vaskulitisa, kao i etiologiju krioglobulinemije. Također, detaljno je opisan postupak istraživanja, način procjene aktivnosti vaskulitisa, opisan je laboratorijski postupak određivanja krioglobulina, kao i drugih standardnih analiza, definisani su kriterijumi relapsa i remisije, kao i ishoda. Dati su opisi korištenih deskriptivnih i analitičkih statističkih postupaka.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni u formi tabela i grafikona svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisano 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.

Korištena literatura sadrži spisak od 182 reference.

## B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati su pokazali da bolesnici sa krioglobulinemijom bez prisutnog vaskulitisa imaju zajedničke kliničke i imunoserološke osobenosti sa bolesnicima koji imaju vaskulitis: da je krioglobulinemija prisutna dominantno kod osoba ženskog pola (80.1%) i srednjeg životnog doba, da je najčešće, kod oko 76.4% sekundarna, odnosno u sklopu autoimunskih bolesti ili infekcije i da su u sličnoj meri prisutne kliničke (urtikarija/angioedem, malaksalost, artralgijski sindrom, Sjogrenov sindrom, Raynaud, polineuropatija) i laboratorijske karakteristike (III tip krioglobulinemije, prisustvo RF i M komponente u krioprecipitatu, potrošnja komplementa). Ova grupa bolesnika imala je i specifičnosti koje su ih razlikovale od krioglobulinemije u sklopu vaskulitisa (hronična urtikarija/angioedem kod 19.4%, redje prisustvo liveda ( $p < 0.05$ ), prisustvo SEL kod 10.2% bolesnika, niža količina krioglobulina ( $p < 0.01$ ), M komponentu u krioprecipitatu koja nije IgMk ( $p < 0.05$ ) i češće prisustvo ANA ( $p < 0.05$ ) i anti ds DNA ( $p < 0.05$ ) u odnosu na bolesnike sa krioglobulinemijskim vaskulitisom. Rezultati ukazuju da se po svojim kliničkim i laboratorijskim karakteristikama posebno izdvojila i grupa teških u odnosu na lake vaskulitise, gde su teški imali zastupljenije promene na koži tipa ulkusa/gangrena kod 8.2% ( $p < 0.01$ ), češće artralgijske, malaksalost i miopatiju ( $p < 0.05$ ), bubrežnu leziju kod 57.1%. Takođe su imali veće indekse aktivnosti i proširenosti vaskulitisa, BVAS (13.92 vs 6.36) i DEI (7.16 vs 5.0), bolji odgovor na terapiju sa padom BVAS na kraju praćenja ( $p < 0.01$ ), kao i češće relapse vaskulitisa sa bubrežnom lezijom (25%,  $p < 0.05$ ) i smrtni ishod ( $p < 0.01$ ). Bolesnici sa teškim vaskulitisom su imali veće količine krioglobulina (40.5%) i dominantno IgMk u krioprecipitatu kod 14.3%, češće potrošnju komplementa 75.5% i sniženje C1q ( $p < 0.01$ ). Rezultati su takođe ukazali da bolesnici sa esencijalnom krioglobulinemijom, kao posebna podgrupa, imaju vaskulitis prisutan kod 51.1% i purpurne promene češće nego neinfektivne krioglobulinemije ( $p < 0.05$ ) i znatno češće prisustvo urtikarije/angioedema,  $p < 0.01$ , u odnosu na krioglobulinemije druge etiologije. Kod njih su artralgijske i malaksalost redje prisutni ( $p < 0.05$ ), kao i bubrežna lezija i polineuropatija u odnosu na druge forme krioglobulinemije ( $p < 0.01$ ), pojava relapsa vaskulitisa češća nego kod neinfektivnih krioglobulinemija (79.4% vs 52.6%), a postizanje kliničke i laboratorijske remisije češće ( $p < 0.01$ ) nego kod HCV indukovane krioglobulinemije. Bolesnici sa EMC imaju manju količinu krioglobulina u odnosu na druge krioglobulinemije,  $p < 0.05$ , krioglobulinemiju tipa III kod 77.1%, za razliku od HCV krioglobulinemije koji imaju dominantno tip II,  $p < 0.05$ . Potrošnja komplementa ( $p < 0.01$ ) i povišeni imunski kompleksi ( $p < 0.05$ ) su prisutni manje u odnosu na HCV

krioglobulinemiju, a autoantitela (ANA, anti dsDNK, SSA/SSB) u odnosu na neinfektivne krioglobulinemije,  $p < 0.01$ . Rezultati su pokazali i da su se osobine krioglobulina kod bolesnika u zavisnosti od prisustva i težine vaskulitisa kao i njegove etiologije, razlikovale u odnosu na količinu (p<0.01), tip (p<0.05), prisustvo M komponente IgMk (p<0.05). Prisustvo povišenih antiC1q antitela i citokina BLYS nije se razlikovalo u odnosu na prisustvo i težinu vaskulitisa, kao i etiologiju krioglobulinemije, ali se pokazalo da je anti C1q prediktor novih manifestacija vaskulitisa (OD 23.5). Kao prediktori relapsa izvojili su se prisustvo EMC, količina krioglobulina i duže trajanje bolesti, dok je prisustvo anti SSA/SSB antitela negativni prediktor.

### **C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Dosadašnja saopštenja u literaturi dominantno se odnose na detaljnu analizu patofiziološke uloge HCV infekcija u nastanku krioglobulinemije (Ferri C, 1991; Sansonno, 2007; Terrier 2013), pri čemu se smatra da hronična antigenska stimulacija dovodi do proliferacije RF sekretujućih klonova B limfocita. Tek poslednjih godina već se pridaje neinfektivnim krioglobulinemijama i sugeriše da one mogu biti poseban entitet (Perez-Alomino R, 2014). Esencijalne krioglobulinemije u novijoj literaturi nisu detaljnije evaluisane, već se uglavnom razmatraju u sastavu neinfektivnih krioglobulinemija (Trejo O, 2001), kao ni krioglobulinemije koje nisu u sklopu krioglobulinemijskog vaskulitisa (Rieu 2001). Dobro su poznate kliničke i laboratorijske karakteristike HCV posredovanih krioglobulinemija istraživane i u multicentrima studijama (Roccatello D, 2007), kao i njena evolucija i prognoza (Della Rosa, 2011). Međutim podaci iz literature u tom smislu, a koji se odnose na neinfektivne i esencijalnu krioglobulinemiju su retki. Uloga komplementa i monoklonskog RF i takodje je detaljno evaluisana u dostupnoj literaturi (Pietrogrande M, 1995), najčešće u vezi sa HCV posredovanom krioglobulinemijom. Podaci o povezanosti i evolutivnosti krioglobulinemije kao limfoproliferativnim bolestima brojni su u literaturi (Tzioufas A, 1996; Ferri 1998) za HCV posredovane krioglobulinemije, dok je udruženost esencijalne krioglobulinemije u tom smislu nedovoljno poznata. Opisana je prekomerna produkcija stimulatora B limfocita (BLYS), faktora koji je neophodan za sazrevanje i aktivaciju B limfocita (Lake-Bakaar, 2014). Povećana produkcija BLYS opisana je u autoimunskim i limfoproliferativnim bolestima, kao i u MC u okviru HCV infekcije (Hansen A, 2007). Ona narušava imunološku toleranciju vodeći i preživljavanju autoreaktivnih B ćelija sprečavajući njihovu apoptozu, što je karakteristika MC, kao i drugih autoimunskih bolesti. Nema radova

u dostupnoj literaturi koji ukazuju na povezanost povezanost anog nivoa BlyS kod neefektivnih i esencijalne krioglobulinemije. Kod bolesnika sa krioglobulinemijskim vaskulitisom, esto se utvr uju snižene koncentracije C4 komponente komplementa, što bi ukazivalo na predominantno aktivisanje sistema komplementa klasi nim putem (Gorevic P, 2012). Poznato je da se antitela upravljena protiv C1q komponente komplementa nalaze u visokoj koncentraciji kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom i hipokomplementemijskim urtikarijalnim vaskulitisom (HUVS), gde aktivacija komplementa ima važnu ulogu u patogenezi oboljenja. Rezultati jednog istraživanja su pokazala zna ajnu prevalencu anti C1q antitela kod bolesnika sa HCV infekcijom i pretpostavljeno je da su ova antitela marker autoimunosti kod ovih bolesnika (Fadda A, 2015), ali nije poznato da li je prisustvo anti-C1q antitela povezano sa prisustvom krioglobulinemije i klini kim manifestacijama krioglobulinemijskog vaskulitisa (Lienesch DW 2006),kao HCV posredovane i kod krioglobulinemije drugih etiologija.

#### **D) Objavljeni radovi koji ine deo doktroske disertacije**

Snezana Arandjelovic, Branka Bonaci-Nikolic, Aleksandra Peric-Popadic, Vesna Tomic-Spiric, JAsna Bolpacic; Sladjana Andrejevic. "HCV related life-threatening cryoglobulinemic vasculitis treated with plasma exchange and rituximab: case report and literature review", prihva en za publikovanje (potvrda priložena) u asopisu Journal of Infections in Developing countries (JIDC).

#### **E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

Doktorska disertacija "Analiza klini kih i imunoseroloških osobnosti bolesnika sa krioglobulinemijom:doprinosa utvrđivanju fenotipova", dr Snežane Arandjelovi , je kohortna studija uradjena u jednom centru, koja je obuhvatila veliki broj bolesnika sa krioglobulinemijom razli ite etiologije. Do sada u našoj sredini, na takvom broju bolesnika, ovako detaljno i sveobuhvatno nije evalusian problem krioglobulinemije.

Ova doktroska disertacija je uradjena prema svim principima nau nog izstraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci. Poseban kvalitet istraživanju daje višegodišne pra enje bolesnika, što je omogu ilo sagledavanje evolutivnosti krioglobulinemije i ishoda.

Imaju i u vidu da je krioglobulinemija izuzetno heterogena i da može biti bez manifestacija bolesti ili pratećih kliničkih slika različitih težina, od neupadljive do životno ugrožavajućih formi, definisanje kliničkih i imunoseroloških markera koji mogu da na to ukažu i svrstavanje pacijenata sa krioglobulinemijom u grupe standardnog, srednjeg i visokog rizika, predstavlja vrlo značajnu pomoć u kliničkoj praksi. Još uvek nije dovoljno jasno koji parametri utiču na težinu kliničke slike i prognozu bolesnika sa krioglobulinemijom. Definisanje podgrupa bolesnika na osnovu zajedničkih kliničko-laboratorijskih karakteristika i pripadnost određenoj podgrupi što ukazuje na moguće evoluciju i prognozu od značaja je za dalji postupak sa pacijentom. Do danas nema objavljenih rezultata istraživanja koja bi definisala ulogu molekula kao što je B<sub>2</sub>LyS kod esencijalne krioglobulinemije. Utvrđivanje koncentracije B<sub>2</sub>LyS treba da doprinese razumevanju patogeneze krioglobulinemije, kao i izdvajanju podgrupe bolesnika pogodnih za primenu biološke terapije, ali su potrebna dalja istraživanja i na većem broju bolesnika, istraživanja u tom pravcu. Rad je istakao važnost određivanja krioglobulina u evaluaciji bolesnika sa vaskulitisom, i treba da pomogne pravilnom tumačenju pozitivnog nalaza. Istraživanje ima poseban osvrt na karakteristike i značaj do danas slabo istraženih neinfektivnih krioglobulinemija, a pre svega esencijalne krioglobulinemije na koju se odnosi veoma mali broj radova, a u našoj sredini ona nije značajnije istraživana.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom Veću Medicinskog fakulteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Snežane Arandjelović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka,

U Beogradu, 13.07.2016.

Mentor: Prof. dr Branka Bona i Nikoli

---

Komentor: Ass dr sc med Sladjana Andrejevi

---

lanovi Komisije:

Prof. dr Sanvila Raškovi

---

Prof. dr Miodrag oli , akademik, emeritus

---

Doc.dr Mirjana Šefik Bukilica

---