

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.03.2017. godine, broj 5940/09, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**,,IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE KOD PACIJENATA SA RANIM REUMATOIDNIM ARTRITISOM“**

kandidata dr Milice Gruji , zaposlene na Institutu za reumatologiju Beogradu. Mentor je Prof dr sci medNemanja Damjanov, komentor dr sci Zorica Jurani .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof dr Marija Radak Perovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc dr Mirjana Šefik Bukilica, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc dr Bojana Stamenkovi , docent Medicinskog fakulteta u Nišu

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 Milice Gruji napisana je na ukupno 117 strana i podeljena je na slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Bolesnici i metode, Rezultati, Diskusija, Zaklju ci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 15 tabela, 29 grafikona i etiri slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **Uvodu** je dat kratak pregled o tome šta je to reumatoiodni artritis, koji su to genetski, a koji faktori spoljne sredine koji doprinose pojavi ove bolesti. Prikazana je i klinička slika reumatoiodnog artritisa, kako zglobnih tako i vanzglobnih manifestacija bolesti, zatim

klasifikacioni kriterijumi pri dijagnozi reumatoidnog artritisa, kao i lekovi koji se danas koriste, uz rehabilitacionu terapiju i hirurgiju.

Posebna pažnja posvećena je patogenezi ove bolesti. Opisana su dosadašnja saznanja o ulozi urodjenog i starih imuniteta u reumatoidnom artritisu, zatim elijski i citokinski milje koji nastaje pri inflamaciji u zglobovima i kako ti isti inicijatori u i sistemski na celo organizam. Posebno su apostrofirana dosadašnja ispitivanja o ulozi ishrane u nastanku ove bolesti, kao i uticaj određenih dijeta na aktivnost bolesti. Pored toga, objašnjena je i uloga enzima dipeptidil peptidaze IV u aktivaciji imunskog sistema i ali i njena moguća uloga u reumatoidnom artritisu, pogotovo u ranom, nele enom stadijumu bolesti.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Studija je imala za cilj da se prouči moguća povezanost između humoralne i elijske imunoreaktivnosti na antigene prisutne u namirnicama kao što su su gliadin, proteini kravljeg mleka i fitohemaglutinin, sa aktivnošću u bolesti u obolelih od ranog, netretiranog reumatoidnog artritisa. Dodatno, cilj je bio i da se odredi serumska aktivnost i ekspresija DPPIV na mononuklearnim ćelijama krvi kod pacijenata sa RA i da se utvrdi njihova moguća povezanost sa kliničkim pokazateljima bolesti. Ispitivana je i ekspresija IgG receptora na površini imunokompetentnih ćelija.

U poglavlju **Bolesnici i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je obuhvatila 50 bolesnika sa ranim, nele enim RA, kontrolnu grupu obolelih i nih su osobe koje se leče od degenerativnih oboljenja zglobova i ki me, među ovih po polu i po starosti (n=30). U studiji je učestvovala i kontrolna grupa zdravih ispitanika (n=40), ali i bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom (n=30). Sadržaj antitela na proteine iz hrane određivan je ELISA metodom, stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu antiga iz hrane MTT testom, ekspresija DPPIV ispitivana je metodom proteorne citometrije, dok je aktivnost u serumu merena direktnom fotometrijskom metodom.

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. U poglavlju **Literatura** navedene su 263 korištene reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Zna ajno viši nivoi IgG antitela na gliadin uo eni su kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave osobe ( $p=0.014$ ). Nivoi IgA i IgM antitela na proteine kravljeg mleka bili su takodje viši kod pacijenata sa ranim RA u poredjenju sa kontrolnom grupom zdravih osoba ( $p=0.0308$ ), dok nije uo ena zna ajna razlika sa grupom bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova. Stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu glijadina/mleka nije se zna ajno razlikovala izmedju ispitivanih grupa pacijenata sa rRA, zdravih kontrola i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom, ali je uo ena zna ajno niža stimulacija proliferacije limfocita kod bolesnika sa ranim RA u prisustvu samo PHA ( $p< 0.0001$ ), ali i u kombinaciji PHA i gliadin/mleka ( $p< 0.0001/ p< 0.0001$ ) u odnosu na zdrave kontrole i osobe sa degenerativnim reumatizmom. DAS28 nije pokazao zna ajnu povezanost sa nivoima antitela na proteine iz hrane, ali je nivo anti-gliadinских IgA antitela korelirao sa brojem ote enih zglobova i nivoom CRP-a. Gustina receptora za IgG na limfocitima i granulocitima je bila povezana sa nivoom IgG antitela na gliadin. Serumska aktivnost DPPIV je bila zna ajno niža kod pacijenata sa ranim RA ( $p=0.024$ ), kod hroni nih RA ( $p< 0.0001$ ) i kod bolesnika sa degenerativnim reumatskim bolestima ( $p< 0.0001$ ) u odnosu na zdrave kontrole. Iako je procenat ukupnih CD26+ leukocita bio zna ajno snižen kod bolesnika sa ranim RA, procenat CD26+ limfocita i monocita, kao i gustine CD26 na ovim elijama kod ovih pacijenata se nije razlikovalo u odnosu na zdrave osobe. DAS28 nije bio povezan sa ekspresijom ili serumskom aktivnoš u DPPIV, ali je uo ena zna ajna negativna povezanost izmedju trajanja simptoma bolesti i serumske aktivnosti DPPIV.

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

Mukoza gastrointestinalnog trakta je stalno izložena ogromnom broju egzogenih antigena kakvi su hrana, metaboliti, patogene bakterije, normalna flora intestinalnog trakta. Kako bi se odvojili nutrijenti od potencijalno ošte uju ih antigena, brojne strukturne i imunološke determinante su uklju ene u proces koji se naziva oralna tolerancija (Vickery i sar., 2011). Manji broj radova je analizirao prisustvo antitela na gliadin u reumatoidnom artiritisu. Hvatum i saradnici (Hvatum i sar, 2006) su pokazali da su IgM antitela na gliadin u serumu zna ajno povišeni kod pacijenata sa RA u odnosu na zdrave kontrole. Novija studija (Li i sar, 2016) je pokazala da su i nivoi IgG antitela na kravljje mleko zna ajno povišeni kod pacijenata sa RA. Rezultati u našoj studiji su pokazali da su povišeni nivoi IgG antitela na gliadin, ali i IgA i IgM antitela na proteine kravljeg mleka prisutni kod pacijenata sa ranim reumatoidnim

artritisom. Dodatno, uo eni su i povišeni nivoi IgG antitela na ovaj antigen kod pacijenata sa veoma ranim reumatoidnim artritisom. Ovi podaci se slažu sa prethodno publikovanim radovima o povišenoj imunoreaktivnosti na gliadin i na kravljie mleko (O'Farrelly i sar, 1988; Paimela i sar, 1995).

Antitela u IgG klasi imaju posebno mesto u patogenezi reumatoidnog artritisa (ACPA su u najve em procentu upravo ove klase imunoglobulina). Ova antitela ostvaruju svoj efekat putem vezivanja za IgG receptore, tzv. Fc R receptore. Postoje tri klase ovih receptora: Fc IR (CD64), Fc RII (CD32) i Fc RIII (CD16). U našem istraživanju uo en je sniženi procenat CD16+ limfocita i NK elija (CD16+CD56+) kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom. Takođe, ekspresija ovih površinskih molekula na limfocitima je bila pove ana kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Ovi rezultati su delimi no u saglasnosti sa ranije objavljenom studijom Aramakija i saradnika (Aramaki i sar, 2009), koji su pokazali da kod pacijenata sa hroni nim reumatoidnim artritisom postoji snižen procenat limfocita i NK elija, ali i snižena ekspresija CD16 molekula na površini NK elija. Procenat CD16+ granulocita se nije razlikovao izmedju ispitivanih grupa u našoj studiji, ali su pacijenti sa ranim reumatoidnim artritisom imali zna ajno ve u ekspresiju CD16 molekula na granulocitima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba. Sli ni rezultati publikovani su i ranije (Paoliello-Paschoalato i sar, 2014).

Koreaciona analiza parametara imunoreaktivnosti na proteine iz hrane u našem istraživanju pokazala je pozitivnu povezanost izmedju IgG antitela na gliadin i procenta CD16+ limfocita, ali i direktnu povezanost sa ekspresijom ovog molekula na površini granulocita. Ovo je prva studija koja je ispitivala mogu u povezanost ovih antitela i receptora za IgG (Fc III receptor) na belim elijama krvi. Ovaj rezultat bi mogao ukazati na to da IgG antitela na gliadin mogu imati ulogu u aktivaciji efektorskih elija imunog sistema putem vezivanja za upravo IgG (Fc III) receptor. Kao posledica ovog vezivanja može do i do produkcije proinflamatornih citokina kao što je TNF-, ali i do pokretanja antitelom posredovane elijske citotoksi nosti (ADCC) (Clemenceau i sar, 2008). Korelacija izmedju IgG anti-glijadinskih antitela i ekspresije CD16 molekula na površini granulocita uo ena u našoj studiji, sugerise da bi upravo ova antitela mogla biti okida za aktivaciju granulocita (a medju njima i neutrofila) i mogla zapo eti formiranje neutrofilnih zamki.

Uo eno je da kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom, fitohemaglutinin dovodi do poreme aja regulacije limfocitne proliferacije, međutim sa kontroverznim zaklju cima:

snižena stimulacija proliferacije limfocita pokazana je od strane Percy-ja i saradnika (Percy i sar, 1978), dok je Ponchel sa saradnicima pokazao pozitivne efekte fitohemaglutinina na stimulaciju atipi nih podgrupa T elija (Ponchel i sar, 2002). O'Keeffe je sa saradnicama pokazao da kod pacijenata sa celijkom, gliadin može da indukuje produkciju IL-2, IL-6 i IFN- (O'Keeffe i sar, 1999). Podaci o uticaju proteina iz kravljeg mleka na stimulaciju proliferacije limfocita kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom gotovo da nema. Međutim, kod pacijenata sa hipersenzitivnošću na proteine kravljeg mleka, uočen je pozitivni proliferativni efekat na limfocitni odgovor na ovaj antigen (Motrich i sar, 2003). Značajno sniženje stimulacije limfocitne proliferacije u prisustvu fitohemaglutinina i u prisustvu kombinacije fitohemaglutinina i glijadina/ proteina kravljeg mleka je uočena kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom.

Poznato je da DPPIV/CD26 ima važnu ulogu u razvoju, sazrevanju, aktivaciji i diferencijaciji T elija, kao i da utiče na njihovu funkciju u imunskom sistemu (Fan H i sar, 2003). Ekspresija DPPIV/CD26 na T elijama u perifernoj krvi i sinovijalnoj teosti je povećana kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Mizokami A i sar, 1996). Rezultati ove disertacije su pokazali da se procenat CD26+ limfocita kod pacijenata sa ranim nelevenim reumatoidnim artritisom nije razlikovao od procenta ovih elija kod zdravih osoba, dok je procenat CD26+ limfocita bio znaczajno viši u grupi bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artirtsom nego kod pacijenata sa ranim RA, ali se nije razlikovao od zdravih osoba. Ovi nalazi delimično su u kontrastu sa do sada publikovanim rezultatima gde je uočen povišen procenat CD26+ T limfocita kod pacijenata sa dugogodišnjim reumatoidnim artritisom (Sedo A i sar, 2005). Ovo je prva studija o CD26 ekspresiji na limfocitima u ukupnoj populaciji leukocita kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artirtsom. Premda je uočena povećana ekspresija CD26 molekula na površini mononuklearnih elija periferne krvi kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom, ova razlika nije bila znaczajna u poređenju sa zdravim osobama. Ovi rezultati su delom u kontrastu sa publikovanim istraživanjem Ellingsen-a (Ellingsen T i sar, 2012), koji je detektovao povećanu ekspresiju CD26 na monocitima, ali bez razlike u ekspresiji CD26 molekula na CD4+ T limfocitima kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave kontrole. Ekspresija CD26 na limfocitima i monocitima pacijenata sa hroničnim reumatoidnim artritisom u našoj studiji pokazala je znaczajno nižu gustinu CD26 molekula na ovim elijama kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom nego kod zdravih kontrola. Ova studija nije potvrdila povezanost između nivoa ovih antitela u krvi i kliničkih pokazatelja aktivnosti bolesti, te se ne može zaključiti da postoji direktni uticaj ishrane na aktivnost bolesti.

Medjutim, uo ena povezanost izmedju IgG antitela na gliadin i povišene ekspresije receptora za IgG na limfocitima i granulocitima pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom govori u prilog mogu oj ulozi antitela na ispitivane proteine hrane u aktivaciji ovih elija i pokretanju imunskog odgovora.

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

*Grujic M, Matic IZ, Crnogorac MD, Velickovic AD, Kolundzija B, Cordero OJ, Juranic Z, Prodanovic S, Zlatanovic M, Babic D, Damjanov N. Activity and expression of dipeptidyl peptidase IV on peripheral blood mononuclear cells inpatients with early steroid and disease modifying antirheumatic drugs naïve rheumatoid arthritis. Clin Chem Lab Med. 2017 Jan 1;55(1):73-81.*

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

Doktorska disertacija „Imunoreaktivnost na proteine iz hrane kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom“ dr Milice Gruji predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju uticaja hrane na patogenezu reumatoidnog artritisa. Rezultati ove teze upu uju na to da antigeni hrane koji se svakodnevno unose u organizam mogu indukovati odgovor imunskog sistema, te doprineti pojavi hroni ne imunske stimulacije i nastanku autoreaktivnih klonova. Ova imunoreaktivnost na proteine iz hrane kakvi su gliadin, kravljie mleko i fitohemaglutinin, upu uje na sluznicu creva kao mogu i izvor autoimunskih fenomena u reumatoidnom artritisu. Stoga treba imati na umu da bi kod ovih pacijenata hroni na stimulaciju elija imunskog odgovora uzrokovanu nekim od stalno prisutnih proteina hrane mogla doprineti bržoj progresiji bolesti, ali i smanjenju efikasnosti primenjene terapije. Posmatrano sa terapijskog aspekta, uvo enje dijete sa restrikcijom unosa identifikovanog aktiviraju eg antigena hrane, uz redovnu konvencionalnu terapiju, bi moglo doprineti bržem smirenju inflamatornog procesa, te smanjenju destrukcije zglobova i održavanju duže remisije ili niske aktivnosti bolesti.

Ova doktorska disertacija je uro ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio 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.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Milice Gruji i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademске titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, aprila 2017.

Ilanovi Komisije:

Mentor:

Prof dr Marija Radak Perovi Prof dr Nemanja Damjanov

---

Komentor:

Doc dr Mirjana Šefik Bukilica Dr Zorica Jurani , NSav

---

Doc dr Bojana Stamenkovi