

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a od 13. juna 2016. godine, broj 5940/5, odre ena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata mr sci med dr Tatjane Živanovi Radni , zaposlene na Institutu za reumatologiju u Beogradu, pod nazivom „**Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfakalcidola kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritism**“. Mentor doktorske disertacije je Doc. dr Mirjana Šefik Bukilica, docent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu a komentor Prof dr Jelena Vojinovi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Za lanove Komisije za ocenu završene doktorske disertacije odre eni su:

1. Prof. dr Nemanja Damjanov, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivanka Markovi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Nevena Arsenovi Ranin, profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Na osnovu detaljne analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Tatjane Živanovi Radni „**Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfakalcidola kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritism**“, napisana je na ukupno 126 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 27 tabela i 28 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je istaknuto šta je to autoimunost i autoimunske bolesti. Naglašena je uloga citokina i regulatornih T ćelija u regulaciji autoimunskih bolesti sa posebnim osvrtom na reumatoidni artritis i njegove patofiziološke mehanizme. U uvodu je detaljno je objašnjena fiziologija vitamina D i njegovog aktivnog metabolita hormona D, kao i mehanizam njihovog delovanja. Dat je koncizan prikaz agonista vitamin D receptora. Tako e je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za povezanost statusa vitamina D i autoimunskih bolesti, posebno reumatoidnog artritisa. Potom, razmotrena je uloga oksidativnog stresa u hroni noj inflamaciji tkiva i njegovo mesto u patofiziološkom mehanizmu autoimunskih bolesti, uklju uju i i rematoidni artritis.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Obuhvatili su ispitivanja *ex vivo* i *in vitro* imunomodulatornih efekata al fakalcidola kod zdravih kontrola i kod bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritismom na standardnoj terapiji lekovima koji modifikuju tok bolesti. Tako e ispitivan je uticaj terapije al fakalcidolom na parametre oksidativnog stresa u perifernoj krvi bolesnika sa aktivnim reumatoidnim artritismom i zdravih kontrola. Pored toga analizirani su efekti primene al fakalcidola na parametre aktivnosti reumatoidnog artritisa .

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji koja je sprovedena na Institutu za reumatologiju u Beogradu. Detaljno je opisan na in izbora bolesnika i kontrolne grupe, kriterijumi za uklju enje u istraživanje, kao i kriterijumi za isklju enje iz istraživanja. U ispitivanje su uklju eni pacijenti sa aktivnim reumatoidnim artritismom (RA) koji su se le ili na Institutu za reumatologiju od juna 2012. do juna 2015. godine. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Eti kog komitet Instituta za reumatologiju i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi bolesnici i zdrave kontrole su dali pisani pristanak pre uklju enja u ispitivanje. Pacijenti su bili na standardnoj terapiji metotreksatom (MTX, stabilna doza 10-25mg/nedeljno) tokom najmanje tri meseca i sa aktivnom boleš u tokom najmanje mesec dana. Dijagnoza RA je bila postavljena prema ACR kriterijumima najmanje šest meseci pre uklju enja u istraživanje. Studijski protokol je podrazumevao nastavak prethodne terapije bolesnika uz dodatak al fakalcidola u dozi od 2 µg dnevno tokom 12 nedelja. Akcenat istraživanja je stavljen na eksperimentalni deo koji se odnosi na analizu stimulisane produkcije citokina u kulturi *in vitro* al fakalcidolom tretiranih mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa aktivnim RA i zdravim kontrolama kao i analizu stimulisane produkcije citokina pre i posle terapije al fakalcidolom kod bolesnika sa

RA. Ex vivo deo istraživanja podrazumevao je određivanje parametara oksidativnog stresa i profila regulatornih T limfocita kod zdravih kontrola i bolesnika sa RA pre i posle terapije al fakalcidolom. Pra eni su i klini ki i laboratorijski parametri aktivnosti bolesti.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Rezultati su statisti ki obra eni odgovaraju im testovima i prikazani u skladu sa standardima za ovu vrstu na no-istraživa kog rada.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, detaljno su analizirani dobijeni rezultati istraživanja, redosledom kojim su prikazani u prethodnom poglavlju, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaklju ci su u formi jasno definisanih konstatacija, redosledom koji odgovara postavljenim ciljevima.

Literatura sadrži 259 bibliografskih jedinica iz referentnih me unarodnih i doma ih asopisa, udžbenika, pretežno novijeg datuma.

Biografija kandidata je priložena.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U ovom istraživanju ustanovljena je statisti ki zna ajna promena stimulisane produkcije citokina u *in vitro* uslovima pod dejstvom al fakalcidola. Naime, u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi kontrolne grupe zdravih doslo je do statisti ki zna ajnog smanjenja koncentracije proinflamatornih citokina IL-17, IL-21 i TNF-a, dok je produkcija antiinflamatornih citokina IL-4 i IFN-gama bila statisti ki zna ajno ve a nakon suplementacije al fakalcidolom. Veoma sli an, ali još ubedljiviji efekat je dobijen u grupi bolesnika sa aktivnim RA. Pod dejstvom al fakalcidola došlo je do statisti ki visoko zna ajnog smanjenja produkcije IL-17, IL-21, TNF-a dok je produkcija IL-6 takodje pokazala tendenciju smanjenja. Nasuprot tome, došlo je do statisti ki zna ajnog pove anja koncentracije IL-4, TGF-beta, IFN-gama i IL-10. Rezultati u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi pokazali su nedvosmisleni inhibiciju produkcije proinflamatornih citokina kako od strane al fakalcidola tako i od strane metilprednizolona i kalcitriola

Kada je analizirana stimulirana produkcija citokina u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa RA pre i posle terapije al fakalcidolom u dozi od 2 µg dnevno tokom 12 nedelja, na en je statisti ki veoma zna ajan pad produkcije IL-6, kao i IL-17 i TNF-alfa.

U grupi bolesnih pre studijskog tretmana koncentracija IL-21 je bila statisti ki znacajno niža u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon studijskog tretmana doslo je do pove anja stimulisane produkcije ovog citokina. Rezultati su pokazali izuzetno važne efekte terapije al fakalcidolom na produkciju antiinflamatornih citokina. Produkcija IL-4 u grupi bolesnika pre tretmana al fakalcidolom bila je statisti ki znacajno niža u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon dvanaestonedeljne terapije al fakalcidolom doslo je do porasta nivoa produkcije IL-4 i IL-10.

Sli no je bilo i sa produkcijom TGF-beta i IFN-gama. Nakon studijskog protokola, došlo je do statisti ki zna ajno ve e stimulisane produkcije ovih citokina u kulturi.

Analizom regulatornih T limfocita u perifernoj krvi imunofluorescentnim bojenjem i proto nom citofluorimetrijom prime ena je manja u estalost aktiviranih Treg ćelija (Tregs prema ukupnim CD4+T ćelijama) u grupi bolesnika sa aktivnom boleš u pre zapo injanja studijskog protokola u odnosu na zdrave kontrole. Me utim, nakon dvanaestonedeljnog tretmana al fakalcidolom, u grupi bolesnika u estalost aktiviranih Treg ćelija je bila pove ana.

Parametri aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx), nivo GSH u eritrocitima kao i koncentracija MDA u plazmi, bolesnika sa aktivnim RA pre i posle 12 nedelja tretmana al fakalcidolom, kao i kontrolne grupe pokazali su zna ajne efekte ove terapije u smislu ja anja antioksidativne zastite i smanjenja oksidativnog stresa u krvi obolelih. Imunomodulatorni efekti al fakalcidola primenjenog in vivo i in vitro kod bolesnika sa aktivnim RA bili su u skladu sa smanjenjem aktivnosti RA. Prime ena je zna ajna pozitivna korelacija izme u promene aktivnosti katalaze i promene nivoa C-reaktivnog proteina kod bolesnika sa RA.

Važno je napomenuti i to da tokom dvanaestonedeljnog tretmana i perioda pra enja nakon toga, nije doslo do pojave neželjenih efekata kod ispitivanih bolesnika.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Forma 25(OH)D ima najveću koncentraciju u humanom serumu i najstabilniji je metabolit vitamina D, sa visokim afinitetom se vezuje za serumski vitamin D-vezuju i protein u krvi

kao i za druge proteine iz superfamilije albumina. Kao takav, 25(OH)D u serumu je najbolji pokazatelj dostupnog vitamina D u domaćina, nastalog ili sintezom u koži ili unosom putem ishrane. Ipak, ovaj oblik još uvek nije hormon; on je zapravo prehormon prirodnog hormona i skoro da ne vrši bilo kakvu biološku ulogu u organizmu (Nuti i sar, 2006). Kao rezultat negativne povratne sprege kojom se kontrolise poslednji korak aktivacije 25(OH)D u aktivnu formu 1,25(OH)₂D₃ u bubrežima, suplementacija običnim vitaminom D nikada ne može dovesti do povećanja nivoa hormona D do nivoa koji može imati imunomodulatorne i/ili antioksidativne efekte (Nordin i sar. 1999; Lau i Baylink, 1999).

U istraživanju dr Tatjane Živanović Radnić je pokazano da u in vitro uslovima alfa-kalcidol i kalcitriol ispoljavaju uporedive imunomodulatorne efekte. Međutim, upotreba alfa-kalcidola umesto kalcitriola omogućava upotrebu visokih doza sa manjim rizikom od hiperkalcemije, što povećava njegov potencijal kao terapijskog sredstva (Lau i Baylink, 1999).

Rezultati istraživanja dr Tatjane Živanović Radnić su pokazali da postoji razlika u citokinskom profilu u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika nakon dvanaestonedeljnog tretmana oralnim preparatom alfa-kalcidola. Koncentracija proinflamatornih citokina je bila niža nakon tretmana alfa-kalcidolom u odnosu na koncentraciju ovih citokina na početku studije. Sličan rezultat ali u nivou serumskih citokina je dobijen u studiji Zold E. i sar (2010.) i Shih i Targan 2008. Obzirom da je studija Yold E. i sar. radjena na pacijentima sa nediferentovanom bolešću vezivnog tkiva, koja je takođe autoimunska oboljenja, pokazano je da je citokinski profil potpuno drugačiji u odnosu na bolesnike sa aktivnim RA. Smatra se da je superoksidni anjon (O₂⁻) jedan od inicijatora slobodno radikalnih reakcija. SOD je enzim odgovoran za konverziju O₂⁻, važnog ROS, u vodonik peroksid (H₂O₂). U ovoj studiji, tretman alfa-kalcidolom značajno je smanjio aktivnost SOD u eritrocitima pacijenata sa aktivnim RA do nivoa dobijenih u zdravoj kontrolnoj grupi. Slični rezultati su pokazani u studiji Radović i sar, 2012., gde je pokazano da tretman alfa-kalcidolom kod bolesnika sa juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA), smanjuje aktivnost SOD do nivoa čak nižeg nego u kontrolnoj grupi zdravih, potvrđujući i time ulogu vitamina D u regulaciji redoks sistema ćelije.

Slično, u studiji Cimen MY et al. (2000.) primećeni su viši nivoi SOD kod pacijenata sa RA nego u kontrolnoj grupi, ukazujući na to da bi prekomerna produkcija slobodnih radikala mogla biti preko ksantin - ksantin oksidaza sistemom kao posledica poremećaja antioksidantnog sistema. Isto tako, Vijaikumar D. (2006.) i sar u svojoj studiji pokazali su

povećanje nivoa SOD i GPx koji mogu biti prisutni zbog dismutacije viška superoksidnih radikala koji se generišu i difunduju sa mesta zapaljenja i zbog čega dolazi do povećane ekspresije antioksidativnog sistema odbrane RA pacijenata. Međutim druge studije (Akiol i sar. 2001. i Ozkan i sar. 2007.) nisu pokazale nikakve promene u nivou aktivnosti SOD izmeđ u pacijenata sa RA i kontrola. CAT i GPx su enzimi uključeni u neutralizaciju H₂O₂. U ovoj studiji aktivnost CAT bila je veća u eritrocitima bolesnika sa RA pre tretmana u poređenju sa kontrolama. Pored zaštite ćelija od oštećenja izazvanog ROS, pokazano je da ekspresija CAT in vitro i in vivo utiče na ekspresiju gena odgovornih za zapaljenje (Benhamou i sar, 1998). Zanimljivo, samo za katalazu je u istraživanju utvrđeno da dvanaestonedeljna terapija alfacalcidolom vrlo značajno smanjuje aktivnost ovog enzima do nivoa značajno nižeg u poređenju sa zdravim kontrolama. Poznato je da je ovaj enzim izrazito povišen u sinovijskoj tečnosti bolesnika sa RA (Biemond i sar, 1994). Pored nivoa glutaciona i aktivnosti antioksidativnih enzima takođe procenjavano je prisustvo lipidne peroksidacije merenjem nivoa MDA. Rezultati su pokazali da su kod bolesnika, nivoi MDA značajno povišeni u poređenju sa kontrolama, ali posle terapije alfacalcidolom pacijenata nivoi MDA u plazmi su bili niži, što je u skladu sa nalazima drugih studija (Radovic i sar 2012; Bao i sar 2008) koje govore u prilog postojanja zaštitne uloge alfacalcidola u prooksidativnim uslovima.

U nekoliko studija sa animalnim modelima, pokazano je da T regulatorne ćelije imaju predominantno proinflamatornu ulogu u patofiziološkim procesima nekih oboljenja, dok rezultati drugih studija dokazuju njihovu ulogu u inflamatornim procesima u zglobovima. Zaiss i sar, 2008 u svojoj studiji su pokazali da je povećanje aktivnosti i broja Treg ćelija ima veoma dobre efekte u lečenju inflamacijom- indukovano gubitka koštane mase u bolesnika sa RA, kao i u poboljšanju kliničkih znakova u artritisu. U istraživanju dr Tatjane Živanović Radnić pokazano je da nakon tretmana alfacalcidolom dolaza do porasta procenta aktiviranih T regulatornih ćelija što je u skladu sa rezultatima nekoliko studija koje su pokazale mogućnost Treg ćelija da suprimiraju inflamatorni odgovor kako u bolesnika tako i u animalnim modelima artritisa (Epple i sar. 2006, Boyc i sar. 2010, Chen i sar. 2011)

U ovoj studiji, pokazano je da alfacalcidol ima povoljne efekte na Th1/Th17 i Th2 profil citokina kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritisom. Štaviše, alfacalcidol je potencirao produkciju antiinflamatornih citokina, dok je proizvodnja proinflamatornih citokina bila suprimirana. Nakon dvanaestonedeljnog tretmana alfacalcidolom, došlo je do značajnog poboljšanja parametara aktivnosti bolesti. Rezultati su u skladu sa rezultatima

studije Anelković i sar., 1999. u kojoj je pokazano statistički značajno kliničko poboljšanje kod pacijenata sa RA tretiranih alfacalcidolom, kako u smislu globalne procene lekara tako i u određivanim parametrima akutne faze.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

T. Živanović Radni, K. Simić-Pašalić, M. Šefik Bukilica, S. Misirlić Denić, A. M. Isaković, T. Stojković, N. Petronijević, N. Damjanov, J. Vojinović. **“Alfacalcidol modulates oxidative stress parameters in the peripheral blood of patients with active rheumatoid arthritis”**. *J. Serb. Chem. Soc.* (2016), doi: 10.2298/JSC160506039Z.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija **“Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfacalcidola kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritisom”** dr Tatjane Živanović Radni je aktuelna, značajna i predstavlja originalni naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na potencijalne nove terapijske agense koji imaju imunomodulatorni efekat. Ovo istraživanje je utvrdilo da alfacalcidol deluje na različite nivoe koji učestvuju u patogenezi reumatoidnog artritisa kao što su citokinski profil, profil regulatornih T ćelija i oksidativni stres što objašnjava njegove povoljne efekte pri primeni kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

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 navedenih podataka, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati disertaciju mr sci med dr Tatjane Živanović Radni pod nazivom „Ispitivanje imunomodulatornih efekata alfa-kalcidola kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritisom“ i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 05.07.2016.

Članovi Komisije:

Mentor

Doc. Dr Mirjana Šefik Bukilica

Komentor

Prof. Dr Jelena Vojinović

Prof. dr Nemanja Damjanović

Prof. dr Ivanka Marković

Prof. dr Nevena Arsenović Ranin