

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 13.06.2016. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa filadelfija-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama“

kandidata Mr sci med dr Dijane Šefer, zaposlene na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Predrag Miljić, komentor NS dr Vladan Čokić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Mirjana Gotić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof dr Andrija Bogdanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ivana Urošević, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija Mr sci med dr Dijane Šefer napisana je na ukupno 133 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, radna hipoteza, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 32 tabele, 12 grafikona, 2 sheme i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su opisane osnovne karakteristike mijeloproliferativnih neoplazmi i navedena je aktuelna klasifikacija ove grupe bolesti na podtipove prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije. Opisana je molekularna patogeneza mijeloproliferativnih neoplazmi. Navedeni su kriterijumi za dijagnozu podtipova: policitemije vere, esencijalne trombocitemije i primarne mijelofibroze. Opisani su tip, učestalost i lokalizacija

tromboembolijskih komplikacija, koje predstavljaju vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u ovim bolestima. Navedeni su do sada poznati faktori rizika za trombozu, koji su potvrđeni velikim kliničkim studijama u ovim bolestima. Takođe je opisan postupak stratifikacija bolesnika sa mijeloproliferativnim neoplazmama na osnovu rizika za pojavu tromboze, ali je istaknuto da su sadašnji modeli stratifikacije prema riziku za trombozu relativno nepouzđani. To je najpre posledica činjenice da ovi modeli ne uključuju faktore koji su važni za nastanak tromboze. U uvodnom delu je opisano savremeno shvatanje mehanizama koji dovode do protrombogenog stanja i trombotičnih komplikacija kod bolesnika sa mijeloproliferativnim neoplazmama. Poseban osvrt bio je posvećen mehanizmima ćelijskih interakcija i stvaranja leukocitno-trombocitnih agregata kao i njihovom značaju za nastanak trombofilnog stanja. Istaknuto je da i pored toga što je ispitivan u nekoliko retrospektivnih studija, prognostički značaj leukocitno-trombocitnih agregata za nastanak tromboembolijskih komplikacija još uvek nije definisan.

Primarni cilj rada podrazumeva ispitivanje prediktivnog značaja markera aktivacije ćelija krvi i endotela za nastanak tromboembolijskih događaja u mijeloproliferativnim neoplazmama. Kao ciljevi rada su takođe navedeni ispitivanje povezanosti mutacija u genima (JAK2, MPL i TET2) i karakteristika *in vitro* rasta prethodnika hematopoeze sa tromboembolijskim događajima. Na kraju, jedan od ciljeva rada je ispitivanje uticaja mijelosupresivne terapije na markere aktivacije ćelija krvi i endotela.

U poglavlju **bolesnici, materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj kohortnoj studiji koja je sprovedena u Klinici za hematologiju KCS. Istraživanje je obavljeno u dve faze: prva je obuhvatala period neposredno posle postavljanja dijagnoze mijeloproliferativne neoplazme, a pre započinjanja lečenja i druga posle postizanja odgovora na primenjenu terapiju. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje pacijenata u studiju i plan laboratorijskih ispitivanja. Metodologija korištena u ovom radu je moderna i postupak svih analiza je detaljno opisan, a za potrebe dobijanja opsega referentnih vrednosti laboratorijskih analiza koje se ne rade standardno, u studiju su osim pacijenata sa mijeloproliferativnim neoplazmama uključeni i zdravi ispitanici. Takođe su detaljno objašnjeni kriterijumi za dijagnozu tromboembolijskih komplikacija, kao i dužina i način njihovog praćenja. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti i zdravi ispitanici su bili informisani o svrsi prikupljanja biološkog materijala za eksperimentalni rad i od njih je dobijena saglasnost za učešće u studiji.

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.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 176 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U studiju je uključeno 95 bolesnika sa filadelfija negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama (Ph⁻MPN): 39 sa policitemijom verom (PV), 27 sa esencijalnom trombocitemijom (ET) i 29 sa primarnom mijelofibrozom (PMF). Standardni faktori rizika za trombozu bili su prisutni kod 53.7% ispitivanih bolesnika, odnosno starost preko 60 godina je imalo je 49.5%, a pozitivnu istoriju tromboza 12.6% bolesnika. Najveća učestalost standardnih faktora rizika za trombozu je registrovana u grupi bolesnika sa primarnom mijelofibrozom. Ukupna učestalost kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu (arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, dijabetes melitus, pušenje) je bila značajno veća u grupi bolesnika sa Ph⁻MPN, nego u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika (84.2% vs 27.3%).

Nivoi celularnih i humoralnih markera aktivacije leukocita i trombocita su analizirani u vreme dijagnoze Ph⁻MPN i posle primljene terapije. Prosečne vrednosti leukocitno-trombocitnih (neutrofilno-trombocitnih i monocitno-trombocitnih) agregata su na dijagnozi bile povećane u PV, ET i PMF u odnosu na nivoe u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika ($p < 0.01$), ali bez značajnih razlika između podtipova Ph⁻MPN. Povećani nivoi neutrofilno-trombocitnih agregata su detektovani kod 61.5% PV, 77.8% ET i 62.1% PMF bolesnika. Povećani nivoi monocitno-trombocitnih agregata su detektovani kod 38.5% PV, 48.1% ET i 48.3% PMF bolesnika. Posle primene terapije, prosečne vrednosti neutrofilno-trombocitnih agregata u PV su redukovane na normalu, dok su se u ET i PMF zadržale značajno povišene vrednosti ($p < 0.01$). Prosečne vrednosti monocitno-trombocitnih agregata su se posle terapije normalizovale u PV i PMF, ali su u ET ostale značajno povišene ($p < 0.05$). Prosečni nivoi solubilnih selektina (E-, L- i P) su na dijagnozi takođe bili značajno povišeni u svim podtipovima Ph⁻MPN, u odnosu na grupu zdravih ispitanika. Rezultati merenja nivoa solubilnih selektina posle primenjene citoreduktivne terapije kod selektovane grupe bolesnika sa Ph⁻MPN, koji su inicijalno imali povećane nivoe, su pokazali značajno sniženje u odnosu na nivoe izmerene u vreme postavljanja dijagnoze Ph⁻MPN ($p < 0.01$).

Tokom perioda praćenja koji je iznosio 39 meseci, tromboembolijske komplikacije su se dogodile kod 12.6% bolesnika sa Ph⁺MPN: 4.2% PV, 3.16% ET i 5.26% PMF. Među trombozama koje su se dogodile u celoj grupi bolesnika sa Ph⁺MPN, najčešći je bio cerebrovaskularni insult (50%), dok su tromboze svih ostalih lokalizacija (akutni infarkt miokarda, infarkt slezine, tromboza distalne aorte, plućna embolija, duboka venska tromboza donjih ekstremiteta, tromboflebitis površinskih vena donjih ekstremiteta) bile podjednako zastupljene (po 8.33%). Izvršena je analiza učestalosti pojedinih faktora rizika za trombozu između grupa bolesnika sa Ph⁺MPN sa i bez novih tromboza. Među kardiovaskularnim faktorima rizika, učestalost arterijske hipertenzije je bila značajno veća u grupi bolesnika sa trombozama ($p < 0.05$). Takođe, prosečni nivoi solubilnog P-selektina su bili značajno veći u grupi bolesnika sa trombozama ($p < 0.05$). Prosečne vrednosti nivoa neutrofilno-trombocitnih i monocitno-trombocitnih agregata, kao i nivoa solubilnih E- i L- selektina se nisu značajno razlikovale među ispitivanim grupama bolesnika. Sa ciljem da se ispita protrombogeni uticaj aktiviranih leukocita i trombocita, kao i svih ostalih parametara koji su u literaturi dovedeni u vezu sa povećanim vaskularnim rizikom, primenjena je COX regresiona analiza. U multivarijantnoj COX regresionoj analizi je potvrđeno da povećan nivo monocitno-trombocitnih agregata kod bolesnika sa Ph⁺MPN predstavlja nezavistan prediktor tromboze (HR=1.561, 95% CI:1.007-2.420, $p=0.046$). Takođe je potvrđeno da interakcija između povišenih nivoa monocitno-trombocitnih agregata i arterijske hipertenzije značajno povećava rizik za nastanak tromboze (HR=1.975, 95% CI:1.215-3.212, $p=0.006$).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Povećanje nivoa leukocitno-trombocitnih agregata iznad fizioloških vrednosti se najčešće viđa u bolestima i stanjima povezanim sa inflamacijom i trombozama (Cerletti C I sar, 2012; Radovančević R I sar, 2009.), kakvo takođe postoji i u Ph⁺MPN. U ovoj studiji, merenjem nivoa cirkulišućih leukocitno-trombocitnih agregata metodom protočne citometrije, je utvrđeno da u cirkulaciji bolesnika sa Ph⁺MPN postoji povećan procenat *in vivo* aktiviranih leukocita i trombocita u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljenih studija (Arrellano-Rodrigo E i sar, 2006; Villmov T i sar, 2003; Falanga A i sar, 2005; Alvarez-Larran A i sar, 2008; Coucelo M i sar, 2014.). U ovom prospektivnom istraživanju je utvrđeno da postoji pozitivna korelacija između nivoa cirkulišućih leukocitno-trombocitnih agregata i povećane sklonosti ka trombozi bolesnika sa Ph⁺MPN. Posredstvom multivarijantnog COX proporcionalnog hazard regresionog modela, potvrđeno je da povećanje bazičnih vrednosti monocitno-trombocitnih agregata predstavlja

nezavistan prediktivni faktor za pojavu tromboze. U literaturi nema podataka o sličnom prospektivnom ispitivanju, ali su rezultati ranijih retrospektivnih studija takođe ukazuju na značaj povišene koncentracije leukocitno-trombocitnih agregata za nastanak tromboembolijskih događaja (Coucelo M i sar, 2014; Jensen MK i sar, 2001.).

P-selektin je u literaturi takođe označen kao senzitivan marker aktivacije trombocita i njegove povećane vrednosti u cirkulaciji su utvrđene u mnogim kliničkim situacijama udruženim sa trombozom (Frijns CIM i sar, 1997; Griesshammer M i sar, 1999; Falanga A i sar, 1999.). Značajno povećane koncentracije solubilnog P-selektina su prethodno eksperimentalno potvrđene i u Ph⁺MPN (Robertson B i sar, 2007.), ali njihova povezanost sa povećanom sklonošću ka trombozama nije dokazana. Prisustvo povećanih nivoa solubilnog P-selektina je do sada dokazano kod bolesnika sa tromboembolijskim komplikacijama u okviru PMF (Alvarez-Larran A i sar, 2008.), dok je povećana ekspresija membranskog P-selektina dokazana kod bolesnika sa ET i trombozom (Arrellano-Rodrigo E i sar, 2006.), čime je podržana teorija o ulozi aktiviranih trombocita u trombogenezi. Iako je prosečan nivo solubilnog P-selektina u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN i trombozama bio značajno veći u poređenju sa grupom bolesnika koja nije imala novih tromboza, prediktivna vrednost ovog parametra za trombozu nije potvrđena.

Prediktivni značaj kardiovaskularnih faktora rizika za povećanje sklonosti ka trombozama je potvrđen u ET i uključen u scoring sistem za stratifikaciju bolesnika u grupe rizika (IPSET-thrombosis) (Barbui T i sar, 2012.), ali još uvek nije potvrđen u PV i PMF. Međutim, na osnovu rezultata ove studije, arterijska hipertenzija se izdvojila kao nezavisni faktor rizika za pojavu tromboze u celoj grupi bolesnika sa MPN. Rezultati multivarijantne COX regresione analize su pokazali da je interakcija između nivoa monocitno-trombocitnih agregata i arterijske hipertenzije aditivna. To znači da ukoliko bolesnik sa Ph⁺MPN pored povećanih bazičnih vrednosti monocitno-trombocitnih agregata ima i arterijsku hipertenziju kao komorbiditet, svako dalje povećanje nivoa monocitno-trombocitnih agregata će dodatno povećati rizik za pojavu tromboze.

Iako je protrombotični uticaj JAK2V617F mutacionog statusa i/ili alelnog opterećenja u PV, ET i PMF dokazan u mnogim studijama (Barbui T i sar, 2010; Vannucchi AM i sar, 2007; Lussana F i sar, 2009; Borowczyk M i sar, 2015.), on međutim nije potvrđen u ovom istraživanju. S obzirom na podatke iz literature koji su potvrdili značaj visokog JAK2V617F alelnog opterećenja (> 50%) kao nezavisnog prediktora venskih tromboza u MPN

(Borowczyk M i sar, 2015.), izostanak takve korelacije u ovoj studiji bi se mogao objasniti predominacijom arterijskih tromboza među bolesnicima sa Ph⁺MPN.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Dijana Šefer, Sandra Bizić-Radulović, Nada Kraguljac-Kurtović, Andrija Bogdanović, Vladan Čokić, Predrag Miljić, Bojana Beleslin-Čokić, Vesna Knežević, Olivera Mitrović-Ajtić, Danijela Leković, Mirjana Gotić. „Proliferative characteristics of Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms - clinical implications“. International Journal of Laboratory Hematology (2016).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa filadelfija-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama“ Mr sci med dr Dijane Šefer, je prva studija u kojoj su markeri aktiviranih leukocita i trombocita prospektivno istraživani kao potencijalni faktori rizika za trombozu. Njen originalni naučni doprinos se sastoji u razumevanju uticaja pre svega aktiviranih leukocita i trombocita, ali i drugih faktora rizika (starost, istorija prethodnih tromboza, kardiovaskularni faktori rizika, genske mutacije, in vitro proliferativna aktivnost) na nastanak tromboembolijskih komplikacija u Ph⁺MPN. Ova teza ima nesumnjivo značajan doprinos u prepoznavanju faktora koji povećavaju rizik za pojavu tromboze i identifikaciji bolesnika sa povećanim rizikom za ove komplikacije. Sasvim je jasno da je izabran najbolji način za nalaženje faktora koji mogu pomoći u identifikovanju bolesnika sa Ph⁺MPN, koji su pod povećanim rizikom za razvoj tromboza. Rezultati ove studije ukazuju na to da uprkos terapiji prilagođenoj stepenu rizika procenjenom primenom dosadašnjeg modela, značajan procenat bolesnika sa Ph⁺MPN dobija tromboembolijske komplikacije posle dijagnoze mijeloproliferacije. Rezultati takođe ukazuju na to da povećani nivoi monocitno-trombocitnih agregata predstavljaju nezavistan prediktor za pojavu tromboze. Konkomitantno prisustvo arterijske hipertenzije dodatno potencira prediktivnu ulogu monocitno-trombocitnih agregata. Na taj način povećana koncentracija monocitno- trombocitnih agregata se izdvojila kao nezavisni faktor rizika za pojavu trombotičnih komplikacija. Znajući da je smanjenje rizika za trombozu primarni cilj terapije u Ph⁺MPN, specijalnu pažnju bi trebalo obratiti na lečenje arterijske hipertenzije. S obzirom na nalaz da povećanje bazalnog nivoa monocitno-

trombocitnih agregata predstavlja nezavistan prediktor za trombozu u Ph⁺MPN, za očekivati je da određivanje ovog parametra omogući precizniju identifikaciju bolesnika sa povećanim rizikom od tromboze.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima savremenog naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

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

U Beogradu, 05.08.2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Mirjana Gotić

Prof. dr Andrija Bogdanović

Prof. dr Ivana Urošević

Mentor:

Prof. dr Predrag Miljić

Komentor:

NS. dr Vladan Čokić
