

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Naučno veće Medicinskog fakulteta u Beogradu na sednici održanoj 22. 12. 2011. godine odredilo je članove Komisije za ocenu završne doktorske disertacije kandidata Mr sci Zorice Šumarac, pod nazivom “Primena biomarkera u dijagnostikovanju i praćenju terapijskog odgovora kod Gošeoove bolesti”. Mentor za izradu doktorske disertacije je Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković, Komentor Prof. dr Svetlana Ignjatović.

Imenovana je Komisija u sastavu:

1. Prof. dr Dragana Janić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Milan Petakov, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Nada Majkić-Singh, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta u Beogradu

Članovi Komisije su detaljno proučili priloženu disertaciju i podnose Naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Mr sci Zorice Šumarac “Primena biomarkera u dijagnostikovanju i praćenju terapijskog odgovora kod Gošeoove bolesti” napisana je na 260 strana kucanog teksta. Disertacija se sastoji od sedam poglavlja: uvod, cilj, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. Disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Disertacija je dokumentovana sa 45 tabela i

72 grafikona. Citirana je 341 referenca iz inostrane i domaće literature. Struktura i kompozicija rada u celini sadrži sve elemente i ispunjava sve kriterijume diktorske disertacije.

Poglavlje **Uvod** napisano je na 48 strana teksta. U uvodnom delu prikazani su epidemiologija i etiologija Gošeove bolesti (GB), klasifikacija, patogeneza, simptomatologija, metode dijagnostike i načini lečenja. U ovom delu detaljno su prikazani parametri koji se koriste u laboratorijskoj dijagnostici, praćenju kliničkog toka bolesti i efekata enzimske supstitucione terapije (EST). Posebno je istaknuta enzimska laboratorijska dijagnostika Gošeove bolesti, koja obuhvata određivanje deficitarnog enzima β -glukozidaze i hitotriozidaze. Naglašena je uloga i drugih biomarkera, koji imaju veliki značaj u postavljanju dijagnoze Gošeove bolesti: ukupne kisele fosfataze (ACP), angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) i feritina.

U poglavlju **Cilj rada** precizno su navedeni sledeći ciljevi: uvođenje i primena metoda za određivanje lizozomalnog enzima β -glukozidaze u leukocitima periferne krvi i hitotriozidaze u serumu, kao i optimizacija metoda sa evaluacijom analitičkih karakteristika, kao i određivanje β -glukozidaze i hitotriozidaze u kontrolnoj grupi zdravih osoba u domaćoj populaciji; utvrđivanje kliničkog značaja korišćenja katalitičke aktivnosti enzima β -glukozidaze, hitotriozidaze, ACP i ACE, kao i koncentracije feritina u postavljanju dijagnoze GB i proceni težine kliničke slike; ispitivanje korelacije navedenih biomarkera sa težinom kliničke slike izražene preko *Zimran Severity Score (Severity Score Index, SSI)* pre uvođenja enzimske supstitucione terapije; određivanje korelacije ispitanih biomarkera sa pojedinim kliničkim parametrima: volumenom slezine i jetre, koncentracijom hemoglobina, brojem leukocita i brojem trombocita; utvrđivanje postojanja korelacije između kliničke slike bolesti i rezidualne aktivnosti enzima β -glukozidaze, kao i mogućnosti predviđanja genotipa na osnovu težine kliničke slike i aktivnosti β -glukozidaze; utvrđivanje efikasnosti primene biomarkera: hitotriozidaze, ACP, ACE i feritina u praćenju EST sa ispitivanjem korelacije između biomarkera tokom EST, kao i korelacije biomarkera sa SSI i kliničkim parametrima; procenjivanje dijagnostičke vrednosti hitotriozidaze kod obolelih od drugih bolesti, za koje postoje literaturni podaci o povećanoj aktivnosti: sarkoidozi, tuberkulozi, drugim lizozomalnim

bolestima (Fabry, mukopolisaharidoze tip I, II i IV, Niemann-Pick), malariji i multiploj sklerozi.

U poglavlju **Materijal i metode** izložen je dizajn istraživanja u okviru kohortne studije, dat je opis uključenih bolesnika sa Goševom bolešću (prema uzrastu, polu, tipu bolesti, kliničkoj slici, splenektomisanosti i primenjenoj enzimskoj supstitucionoj terapiji), kao i opis kontrolne grupe zdravih osoba u domaćoj populaciji, kako za određivanje β -glukozidaze, tako i za određivanje hitotriozidaze. U ovom poglavlju dat je detaljan opis metoda koje su korišćene za određivanje katalitičke aktivnosti lizosomalnog enzima β -glukozidaze u homogenatu leukocita periferne krvi (sa metodama ultrazvučne sonifikacije leukocita i određivanja proteina) i metode za određivanje hitotriozidaze, ACP, ACE i feritina u serumu bolesnika sa Goševom bolešću. Detaljno je opisan i *SSI*, kao osnov za procenu kliničke slike bolesnika. Navedene su i korišćene statističke metode: metode deskriptivne statistike, Kolmogorov-Smirnov test, parametarski Student t-test, neparametarski t-test (Mann-Whitney U-test), parametarska korelaciona analiza (Pearsonov test), neparametarska korelaciona analiza (Spearmanov test), analiza ROC (*Receiver Operating Characteristic*) krive.

Rezultati su prikazani na 92 stranice disertacije i sadrže 45 tabela i 72 grafikona. U rezultatima su prvo predstavljene analitičke karakteristike ispitanih i primenjenih metoda za određivanje β -glukozidaze i hitotriozidaze (nepreciznost u seriji i iz dana u dan, detekcioni limit i linearnost), sa vrednostima dobijenim u kontrolnim grupama, kao i karakteristike metoda za određivanje ACP, ACE i feritina. Zatim je predstavljena klinička vrednost ispitanih biomarkera u dijagnozi Goševе bolesti (pre uvođenja EST), kao i tokom primene EST u periodu od 6 godina. Prikazani su rezultati ispitanih korelacija između biomarkera, između biomarkera i *SSI*, pre uvođenja i tokom EST. U rezultatima je takođe prikazan i klinički značaj hitotriozidaze u drugim bolestima (sarkoidozi, tuberkulozi, drugim lizosomalnim bolestima, malariji i multiploj sklerozi).

Poglavlje **Diskusija** obuhvata 50 strana disertacije i u njemu je komparativno prikazan značaj dobijenih rezultata. Rezultati dobijeni ovim ispitivanjem su u saglasnosti sa većim brojem dosadašnjih studija. Oni ukazuju na značajnost

laboratorijske dijagnostike i pouzdanost uvedenih metoda za određivanje β -glukozidaze i hitotriozidaze u cilju postavljanja dijagnoze i praćenja terapije obolelih od Goševove bolesti. Rezultati rada pokazuju da je hitotriozidaza u odnosu na ACP, ACE i feritin, najspecifičniji biomarker za Goševu bolest, uprkos postojanju njegovog genetskog deficita u oko 6% opšte populacije. Veću aktivnost hitotriozidaza je imala kod pacijenata sa težom kliničkom slikom (*SSI* 11–25). Utvrđena je značajna korelacija između biomarkera u bazalnom periodu i aktivnosti hitotriozidaze sa *SSI*. Hitotriozidaza je pokazala najveće sniženje tokom praćenja EST i to najviše tokom prve godine primene terapije. Poređenjem značajnosti određivanja hitotriozidaze kod bolesnika sa Goševom bolešću i bolesnika sa sarkoidozom, tuberkulozom, drugim lizosomalnim bolestima, malarijom i multiplom sklerozom u odnosu na kontrolnu grupu, utvrđeno je da hitotriozidaza kod GB najbolje razdvaja bolesne od zdravih ispitanika.

U **Zaključcima** navedenim u 39 tačaka i 5 konačnih zaključaka, jasno je odgovoreno na postavljene ciljeve istraživanja.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Rad je deo kohortne studije započete 2002. godine, u koju su uključeni bolesnici oboleli od GB (n=40) i klinički suspekti bolesnici (n=150). 37 bolesnika su sa tipom 1 GB a 3 bolesnika sa tipom 3 GB. Tokom vremena ispitivanja 9 pacijenata je bilo splenektomisano. Na osnovu *SSI* kategorizacije težine kliničke slike, 21 pacijent je klasifikovan kao blag oblik GB, dok je 19 pacijenata klasifikovano sa srednje teškim oblikom GB. Tokom proteklog perioda, 27 pacijenata je bilo na EST, sa različitom dužinom terapije (1–7 godina). Kontrolna grupa za određivanje β -glukozidaze sastojala se od 70 zdravih osoba iz domaće populacije a kontrolna grupa za određivanje hitotriozidaze sastojala se od 264 zdrave osobe. Ispitivanjem analitičkih osobina metoda za određivanje β -glukozidaze i hitotriozidaze potvrđeno je da se mogu smatrati pouzdanim za korišćenje u dijagnostici GB, praćenju kliničkog toka bolesti i praćenju efekata enzimske supstitucione terapije. Određivanje nivoa β -glukozidaze i hitotriozidaze je visoko značajno prediktivno za dijagnozu GB.

Ispitivani biomarkeri: hitotriozidaza, ACP, ACE i feritin kod bolesnika sa GB su imali značajno visoke vrednosti u bazalnom periodu, pre početka terapije. Bolesnici sa težom kliničkom slikom (*SSI* 11–25) su imali povećane vrednosti hitotriozidaze u odnosu na bolesnike sa blažim oblikom bolesti (*SSI* 0–10). Iz dobijenih rezultata ne može se doneti zaključak o mogućnosti predikcije težine kliničke slike, kao i genotipa na osnovu rezidualne aktivnosti β -glukozidaze. U bazalnom periodu dobijene su značajne korelacije između hitotriozidaze, ACP i ACE; između *SSI* i hitotriozidaze, između *SSI* i ACE; između hitotriozidaze i volumena slezine i volumena jetre i između feritina i volumena jetre. Praćenjem promena biomarkera na svakih 6 meseci tokom primanja EST, utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u aktivnosti ispitivanih biomarkera u periodima ispitivanja. Tokom primanja EST, najveće sniženje aktivnosti enzima bilo je tokom prve godine terapije, pri čemu je hitotriozidaza pokazala najveće sniženje u odnosu na ostale ispitane biomarkere. Najmanje promene tokom EST imao je feritin. Tokom primene EST, utvrđeno je postojanje značajne korelacije između biomarkera kao i između hitotriozidaze i broja leukocita i hitotriozidaze i broja trombocita. Nije ustanovljena značajna korelacija između biomarkera i *SSI*. Poređenjem značajnosti određivanja hitotriozidaze kod bolesnika sa Goševom bolešću i bolesnika sa sarkoidozom, tuberkulozom, drugim lizosomalnim bolestima, malarijom i multiplom sklerozom u odnosu na kontrolnu grupu, utvrđeno je da hitotriozidaza kod GB najbolje razdvaja bolesne od zdravih ispitanika.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

U ovoj disertaciji ispitana je klinička vrednost biomarkera β -glukozidaze, hitotriozidaze, ACP, ACE i feritina u postavljanju dijagnoze, praćenju kliničkog toka bolesti i efikasnosti EST kod bolesnika sa GB. Rezultati kliničke primenljivosti β -glukozidaze u dijagnostici GB i vrednosti dobijene kod bolesnika, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika se slažu sa objavljenim literaturnim podacima *Daniels-a* i *Glew-a*, *Moss-a* i saradnika, koji su takođe pokazali da je aktivnost ovog enzima manja od 20% aktivnosti u odnosu na srednju vrednost aktivnosti kontrolne

grupe. Srednja vrednost aktivnosti hitotriozidaze kod bolesnika sa GB i ROC analiza pokazali su da je određivanje nivoa hitotriozidaze visoko značajno prediktivno za dijagnozu GB, što je u skladu sa dosada objavljenim rezultatima *Hollak-ove*, *Aerts-a* i saradnika, kao i rezultatima studije *Zimran-a* i saradnika. Rezultati ispitivanja ACP i ACE kod bolesnika sa GB pokazuju da su i pored svoje nedovoljne specifičnosti, uz hitotriozidazu, značajni biomarkeri u laboratorijskoj dijagnostici GB, što potvrđuju i radovi *Boot-a*, *Deegan-a*, *Cox-a* i *Giralda*. Dobijeni rezultati pokazuju da je hitotriozidaza biomarker, koji je najbolje razdvojio bolesnike sa blagom formom bolesti od bolesnika sa težom kliničkom slikom, što je od velikog značaja, posebno pri uvođenju terapije. Na ovaj način se potvrđuje pretpostavka da hitotriozidaza reflektuje opterećenost organizma aktiviranim makrofagama, što implicira težu kliničku sliku bolesti. Dobijeni rezultati ovog ispitivanja se slažu sa rezultatima dobijenim u studijama *Deegan-a*, *Giraldo-a* i saradnika kao i radovima *Aerts-a*, *Hollak-ove* i saradnika. Dobijena statistički značajna korelacija u bazalnom periodu između hitotriozidaze, ACP i ACE, se slaže sa rezultatima *Vellodi-a* i saradnika, kao i *Cabrera-Salazara*. što potvrđuje da kod bolesnika sa genetskim deficitom hitotriozidaze, vrednosti ACP i ACE mogu biti dovoljno informativne za adekvatan biohemijski monitoring GB. Iz dobijenih rezultata ispitivanih biomarkera tokom primanja EST, može se zaključiti da je najbrže sniženje aktivnosti imala hitotriozidaza i to tokom prve godine primanja terapije, što ukazuje na činjenicu da je EST najefektivnija u prvoj godini (71,4%). *Giraldo* i saradnici su pokazali da dozom od 60–120 U/kg, svake 2 nedelje, tokom 2 godine, dolazi do smanjenja aktivnosti enzima od 40%–70% dok su iskustva *Hollak-ove* i saradnika pokazala su da je 78% bolesnika tokom prve godine terapije smanjilo aktivnost enzima do 15%. Na osnovu rezultata disertacije, kao i rezultata velikog broja studija, može se zaključiti da hitotriozidaza može biti ključni marker u praćenju efektivnosti terapije. Ispitivanje aktivnosti hitotriozidaze kod ostalih bolesti pokazalo je da je određivanje aktivnosti hitotriozidaze značajno prediktivno za dijagnozu aktivne sarkoidoze, malarije i multiple skleroze, kao i pojedinih drugih lizozomalnih bolesti, što je u skladu sa ispitivanjima *Bargagli-a* i saradnika, *Guo-a* i saradnika i *Malaguarnera* i saradnika. Poređenjem značajnosti određivanja hitotriozidaze kod svih ispitanih bolesti, u

odnosu na kontrolnu grupu, utvrđeno je da hitotriozidaza kod GB najbolje razdvaja bolesne od zdravih ispitanika.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

1. Zorica Šumarac, Nada Suvajdžić, Svetlana Ignjatović, Nada Majkić-Singh, Dragana Janić, Milan Petakov, Maja Đordjević, Mirjana Mitrović, Marijana Dajak, Milka Golubović, Predrag Rodić. Biomarkers in Serbian patients with Gaucher disease. Clin Biochem 2011; 44(12): 950–4.
2. Mitrovic M, Antic D, Elezovic I, Janic D, Miljic P, Sumarac Z, Nikolic T, Suvajdzic N. Haemostatic abnormalities in treatment-naive patients with Type 1 Gaucher's disease. Platelets. ISSN: 0953-7104 print/1369-1635 online; DOI: 10.3109/09537104.2011.597526

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Problemi sa kojima se susreće savremena medicinska dijagnostika bolesti lizozoma su: niska incidenca, teškoća pravovremenog kliničkog prepoznavanja, skupa dijagnostička oprema, mogućnost delotvornog lečenja i visoki troškovi lečenja. U velikom broju slučajeva dovode do nedostatka tačne dijagnoze ili njenog kašnjenja koje uzrokuje smrt ili hronični invaliditet bolesnika. S druge strane, pravovremena, tačna dijagnoza često omogućava relativno i uspešno lečenje i preduslov je tačne genetske informisanosti porodice.

Doktorska disertacija Mr sci ph Zorice Šumarac predstavlja originalni naučni doprinos u implementaciji i primeni enzimske metodologije u dijagnostikovanju i praćenju terapije Gošeeve bolesti. Uvođenje metoda za određivanje aktivnosti β -glukozidaze i hitotriozidaze u medicinskim laboratorijama, imaće veliki značaj u korišćenju ovih lizozomalnih enzima u dijagnostici GB u našoj populaciji, kao i praćenju terapije obolelih. Rezultati disertacije ukazuju na mogućnost primene palete

biomarkera i njihov klinički značaj, što će omogućiti njihovu primenu kako u postavljanju dijagnoze tako i u praćenju efekata terapije obolelih od GB.

Na osnovu jasno postavljenih ciljeva i precizno koncipirane metodologije, proizašli su značajni rezultati i zaključci koji imaju veliki značaj u kliničkoj praksi i predstavljaju osnovu daljih naučnih istraživanja. Navedena literatura, sveobuhvatno izložena materija i tumačenje dobijenih rezultata, ukazuju na činjenicu da kandidat dobro poznaje navedenu oblast istraživanja i da je sposoban da izvede odgovarajuće zaključke.

Komisija predlaže Naučnom veću da prihvati izveštaj, predložen na osnovu izvršene analize i da odobri javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom “Primena biomarkera u dijagnostikovanju i praćenju terapijskog odgovora kod Gošeoove bolesti” kandidata Mr sci ph Zorice Šumarac.

Mentor:

Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković

Članovi Komisije:

Prof. dr Dragana Janić

Doc. dr Milan Petakov

Komentor:

Prof. dr Svetlana Ignjatović

Prof. dr Nada Majkić-Singh