

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA
U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.04.2022. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Klinička vrednost antitela na TSH receptore kod pacijenata sa Graves-ovom oftalmopatijom/orbitopatijom**“ kandidata magistra farmacije – medicinskog biohemičara, Marije Sarić Matutinović, asistenta, istraživača –saradnika na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u sastavu:

1. Dr sc. Miloš Žarković – redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
2. Dr sc. Aleksandra Topić – redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
3. Dr sc. Neda Milinković – docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mentori:

1. Dr sc. Svetlana Ignjatović – redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Biljana Nedeljković Beleslin – redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 230 strana, sadrži ukupno 28 slika, 50 tabela i 361 navedenu referencu. Sadržaj doktorske disertacije podeljen je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se utvrdi klinički značaj određivanja antitela na receptore za tireostimulirajući hormon (TSHRA_t) kod pacijenata sa Graves-ovom orbitopatijom (GO). S tim u vezi, prvi cilj je bio da se izvrši analiza demografskih i kliničkih karakteristika ispitivane populacije. Sledeći cilj je bila analiza koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu pacijenata sa Graves-ovom bolesti (GB), Hašimoto tiroiditisom (HT) i eutiroidnim oblikom GO, kao i ispitivanje razlika u pozitivnosti primenjenih laboratorijskih metoda za njihovo određivanje. Takođe, cilj je bio da se ispita povezanost TSHRA_t sa demografskim i kliničkim karakteristikama od značaja, kao i sa tiroidnim statusom pacijenata. U cilju sagledavanja značaja određivanja TSHRA_t kao specifičnog biomarkera kliničke prezentacije i ishoda GO, analizirana je povezanosti koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t sa aktivnošću, težinom GO i sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima. Poseban fokus ove disertacije bio je da se ispituju dijagnostičke karakteristike različitih laboratorijskih metoda za određivanje TSHRA_t. Dodatni cilj je bila i verifikacija analitičkih i dijagnostičkih karakteristika nove imunohemijske metode (Immulate 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t. Osim funkcionalne aktivnosti i koncentracije TSHRA_t, u ovoj disertaciji su analizirani serumski nivoi parametara inflamatornog i oksidativnog statusa organizma (IL-6, IL-1RA, IL-1 β i IL-8, TOS, TAS, OSI, 8-OHdG), kao i njihova povezanost sa TSHRA_t. Na kraju, cilj je bio da se uvrste svi analizirani biomarkeri u multiparametarske modele GO i ispita njihova dijagnostička tačnost.

U poglavlju **Materijal i metode** opisana je ispitivana populacija pacijenata sa GO, dizajn istraživanja i kriterijumi za uključenje i isključenje pacijenata u studiju. Takođe, detaljno je opisan postupak kliničke evaluacije pacijenata, postavljanja dijagnoze i klasifikacije GO. U istraživanju je učestvovao 91 pacijent redovno lečen na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Istraživanje je dizajnirano kao opservaciona studija, a glavni kriterijum za uključenje ispitanika u studiju bila je postavljena dijagnoza GO, dok je kriterijum isključenja bio bilo kakav vid imunosupresivne terapije u poslednjih šest meseci. Dijagnoza je postavljena na osnovu endokrinološkog i oftalmološkog pregleda, ultrazvuka štitne žlezde, ultrazvuka/CT orbite i rutinskog laboratorijskog ispitivanja tiroidne funkcije. Pacijenti su klasifikovani na osnovu postavljene dijagnoze na: pacijente sa GB i GO, pacijente sa HT i GO i pacijente sa eutiroidnim oblikom GO. Klasifikacija pacijenata je izvršena i na osnovu aktivnosti i težine GO, pri čemu je GO definisana kao aktivna ili neaktivna GO, na osnovu vrednosti skora kliničke aktivnosti (CAS) i kao blaga, srednje teška do teška i GO

koja ugrožava vid (distiroidna optička neuropatija i/ili oštećenje rožnjače), na osnovu preporuka Evropske grupe za Graves-ovu orbitopatiju (EUGOGO). Dodatno su u cilju verifikacije CLIA imunohemijske IMMULITE TSI 2000 metode selektovana 23 zdrava ispitanika, uparena po polu i godinama sa pacijentima. Potrebni podaci su dobijeni iz medicinske istorije pacijenata, upitnika specijalno dizajniranih za potrebe ovog istraživanja, kao i iz medicinske baze podataka Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa smernicama Helsinške deklaracije, nakon odobrenja Etičkog odbora Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (17.06.2019/944/3).

Ispitanicima su, za potrebe ove doktorske disertacije, određivani sledeći parametri iz uzoraka venske krvi: ukupna serumska koncentracija TSHRA_t (TBII), serumski nivo stimulatorne i blokirajuće aktivnosti TSHRA_t (TSAb i TBAb, redom), tiroidni funkcionalni testovi (TSH, FT₄, TPOA_t, TGA_t), serumski nivo totalnog oksidativnog stresa (TOS) i totalnog antioksidativnog statusa (TAS) organizma, nivo 8-hidroksi-2-deoksigvanozina (8-OHdG) u plazmi, kao i nivo interleukina (IL-6, IL-1RA, IL-1 β , IL-8) u serumu pacijenata. Funkcionalna aktivnost TSHRA_t izmerena je pomoću tehnike bioeseja u Laboratoriji za molekularna tiroidna istraživanja, Johannes Gutenberg univerzitetskog medicinskog centra u Majncu, u Nemačkoj. Priprema i trijaža uzoraka za ove analize je obavljena u Laboratoriji za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, odakle su uzorci poslani kurirskom službom, na suvom ledu. Stimulatorna i blokirajuća aktivnost TSHRA_t su određene zasebno, primenom komercijalnih bioeseja, a rezultati TSA_b su izraženi kao procenat odnosa uzorka i standarda (SRR%), a TBA_b kao procenat inhibicije signala (% inhibicije). Primenjeni testovi koriste genetski modifikovane jajne ćelije kineskog hrčka (*engl. Chinese Hamster Ovary Cells, CHO*) koje eksprimiraju himerni receptor za TSH (Mc4) i cAMP-inducibilni reporter gen za luciferazu kojim se omogućava merenje luminescentnog svetlosnog signala. Serum pacijenata se inkubira sa CHO ćelijama koje su prethodno zasejane na mikrotitarske ploče. U slučaju prisustva stimulatornih antitela (TSA_b) dolazi do pojačanog stvaranja cAMP što se detektuje kroz reakciju luciferin-luciferaza i posledično stvaranje luminescentnog signala. U slučaju prisustva blokirajućih antitela (TBA_b) dolazi do blokade TSH receptora, posledične inhibicije vezivanja TSH za receptor, inhibicije stvaranja cAMP i svetlosnog signala. Ukupna koncentracija TSHRA_t određena je komercijalnom rutinskom metodom koja je zasnovana na kompetitivnom imunohemijskom elektrohemioluminescentom (ECLIA) principu, na imunohemijskom analizatoru

Cobas e411, proizvođača Roche Diagnostics, u privatnoj medicinsko-biohemijskoj laboratoriji „Beograd“. Dodatno je koncentracija TSHRA_t u serumu pacijenata izmerena i primenom relativno nove nekompetitivne hemiluminescentne imunohemijske metode (CLIA), na imunohemijskom analizatoru IMMULITE 2000, proizvođača Siemens. Ova analiza je sprovedena u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ u Beogradu. Masena koncentracija analiziranih interleukina (IL-6, IL-1RA, IL-1 β , IL-8) u serumu pacijenata izmerena je primenom komercijalnih enzimskih imunohemijskih testova (ELISA), različitih proizvođača. Serumski nivo TOS određen je primenom komercijalne spektrofotometrijske metode bazirane na Erelovom principu koja je aplikovana na biohemijski analizator Olympus AU400, proizvođača Beckman Coulter. Princip se zasniva na oksidaciji ferio jona u feri jon u prisustvu različitih oksidanasa u analiziranom uzorku, pri čemu se stvara obojeni kompleks feri jona i hromogena u kiseloj sredini. Serumski nivo TAS određen je takođe primenom Erelove spktrofotometrijske komercijalne metode, aplikovane na biohemijski analizator Olympus AU400, proizvođača Beckman Coulter. Princip je zasnovan na redukciji obojenog ABTS radikala do bezbojnog redukovanog oblika u prisustvu antioksidanasa u uzorku što se manifestuje smanjenjem intenziteta boje i promenom apsorbancije. Ove laboratorijske analize su sprovedene u Laboratoriji za medicinsko-biohemijske analize, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Dodatno je sprovedena verifikacija analitičkih i dijagnostičkih karakteristika CLIA metode (IMMULITE 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t, u skladu sa smernicama vodiča za verifikaciju performansi preciznosti i tačnosti, Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*engl. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI EP15-A2*). U tu svrhu su prvo ispitivane analitičke karakteristike date metode: preciznost u seriji, preciznost između serija, preciznost iz dana u dan, preciznost unutar laboratorije, ponovljivost i tačnost. Zatim su, u cilju ispitivanja dijagnostičke tačnosti analizirane metode, određene dijagnostička osetljivost, specifičnost, pozitivna, negativna prediktivna vrednost i sprovedena ROC analiza (*engl. Receiver Operating Characteristic, ROC*), poređenjem dobijenih rezultata kod pacijenata i zdravih ispitanika. Statistička analiza podataka dobijenih u ovom radu izvedena je pomoću programa Excel (verzija 2010; Microsoft, SAD), MedCalc (verzija 12; MedCalc Software, Belgija) i SPSS (IBM® SPSS® Statistics version 20, IBM, SAD). Većina analiziranih podataka nije pratila normalnu Gausovu raspodelu zbog čega su većim

delom primenjeni neparametarski statistički testovi u ovoj disertaciji (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Spearmanova korelaciona analiza). Analiza kategoričkih podataka u ovom radu je izvršena primenom Chi-kvadrat testa, a stope pozitivnosti različitih laboratorijskih metoda za određivanje TSHRA_t su upoređene pomoću McNemara testa. Binarna logistička analiza je upotrebljena za ispitivanje prediktivnog potencijala TSHRA_t za razvoj pojedinih kliničkih fenotipova GO. U sklopu analitičke verifikacije IMMULITE 2000 TSI CLIA metode, određeni su sledeći statistički parametri: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent varijacije (Kv), za procenu preciznosti merenja. U cilju provere tačnosti ove metode, izvršeno je poređenje rezultata merenja sa rutinskom kompetitivnom imunoheimijskom metodom, a međusobno slaganje metoda ispitano primenom Wilcoxon testa ekvivalentnih parova i Passing-Bablok regresione analize. Provera dijagnostičke tačnosti metoda sprovedena je određivanjem parametara dijagnostičke tačnosti putem tabela kontigencije, kao i ROC analizom.

U poglavlju **Rezultati**, prvo su prikazane demografske i kliničke karakteristike analizirane populacije. Najpre su opisno predstavljeni osnovni demografski i antropometrijski podaci, pušačke navike i porodična istorija autoimunih bolesti štitne žlezde (AITB), udružene autoimune bolesti i ostali komorbiditeti. Zatim su ispitane razlike u vrednostima navedenih podataka u odnosu na vrstu AITB i u odnosu na aktivnost i težinu GO. Potom su opisno predstavljeni klinički podaci ispitivane populacije: aktivnost GO, CAS skor, težina GO, vrsta AITB, trajanje GO, zastupljenost unilateralnog oblika GO, medikamentozna terapija, suplementacija selenom, neadekvatan odgovor na terapiju GO, prethodna primena radioaktivnog joda, prethodna tiroidektomija, istorija remisije i relapsa hipertiroidizma i fluktuacije tiroidnog statusa. Vrednost CAS skora je upoređena u odnosu na težinu GO. Dodatno su ispitane razlike u trajanju simptoma GO između ispitanika sa aktivnom i neaktivnom GO, kao i između ispitanika sa blagom, umerenom do teškom i GO koja ugrožava vid. Takođe je prikazan tiroidni status ispitivanih pacijenata na osnovu rezultata osnovnih tiroidnih funkcionalnih testova, kao i razlike u tiroidnom statusu u odnosu na aktivnost i težinu GO. U sledećem delu poglavlja **Rezultati** predstavljeni su rezultati analize koncentracije i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u serumu različitih grupa pacijenata sa GO. U ovom delu je grafički prikazana raspodela stimulatorne aktivnosti, blokirajuće aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t u celokupnoj analiziranoj populaciji pacijenata, kao i u pojedinačnim grupama ispitanika (GB, HT i eutiroidna GO). Posebna pažnja je posvećena ispitivanju razlika u vrednostima TSHRA_t između pacijenata sa GB, HT i eutiroidnom

GO. Zatim je analizirana prevalencija stimulatornih, blokirajućih TSHRA_t i njihove ukupne koncentracije u ispitivanoj populaciji pacijenata, odnosno pozitivnost dobijenih rezultata primenom tehnike bioeseja i kompetitivnog imunohemijskog određivanja, redom. Naredni deo ovog odeljka bavio se ispitivanjem povezanosti nivoa funkcionalne aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t sa demografskim i kliničkim podacima od značaja, kao i sa tiroidnim statusom pacijenata. Sledeći deo poglavlja **Rezultati** je posvećen detaljnoj analizi povezanosti TSHRA_t sa kliničkim fenotipom GO. Najpre je u ovom odeljku analizirana povezanost ovog parametra sa aktivnošću i težinom GO, gde su prvo ispitivane pojedinačne razlike nivoa funkcionalne aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t u odnosu na aktivnost i težinu GO, a zatim je analizirana pozitivnost dobijenih rezultata ovih parametara u odnosu na aktivnost i težinu GO. U narednom delu ovog odeljka je analiziran prediktivni potencijal funkcionalne aktivnosti i ukupne koncentracije TSHRA_t za razvoj prvo aktivnog, a zatim teškog oblika GO. Potom je analizirana raspodela TSHRA_t u zavisnosti od dužine trajanja i težine simptoma GO. Poslednji deo ovog odeljka je posvećen ispitivanju pojedinačnih oftalmoloških znakova i simptoma GO u ispitivanoj populaciji, kao i njihovoj povezanosti sa TSHRA_t. Naredni deo poglavlja **Rezultati** tiče se verifikacije analitičkih i dijagnostičkih karakteristika imunohemijske CLIA metode (IMMULITE® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t. Zatim je izvedena komparativna analiza dijagnostičkih karakteristika sve tri primenjene metode za određivanje nivoa TSHRA_t u uzorcima pacijenata, sa akcentom na identifikaciju pogodne metode sa odgovarajućim karakteristikama za uvođenje u rutinsku praksu umesto rutinskih testova. U sledećem odeljku poglavlja **Rezultati** obrađeni su rezultati određivanja nivoa relevantnih citokina (IL-6, IL-1RA, IL-1β i IL-8) u serumu pacijenata i ispitivan njihov klinički značaj u ovoj populaciji pacijenata. Ispitane su razlike ovih parametara u odnosu na demografske i kliničke karakteristike ispitivane populacije pacijenata. Dodatno je analizirana asocijacija ovih parametara inflamacije sa TSHRA_t. U sledećem delu ovog poglavlja analizirani su nivoi parametara oksidativnog statusa (TAS, TOS, 8-OHdG) u odnosu na demografske i kliničke karakteristike pacijenata, kao i njihova korelacija sa aktivnošću i koncentracijom TSHRA_t. Dodatno je ispitana povezanost serumskih vrednosti TAS sa pojedinim oftalmološkim parametrima od značaja i korelacija TAS i TOS sa prethodno analiziranim citokinima. Na kraju poglavlja **Rezultati** kombinovani su svi biomarkeri prethodno analizirani u ovoj disertaciji i pojedinačno ispitana

dijagnostička tačnost ovih multimarkerskih modela za predviđanje aktivnosti i težine GO, u odnosu na pojedinačnu stimulatornu aktivnost TSHRA_t.

Na kraju disertacije, prikazani su **Diskusija** i **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

B. Opis dobijenih rezultata

Analizirana populacija pacijenata je obuhvatala duplo više žena nego muškaraca, u proseku srednje životne dobi. Ovakvi rezultati su u skladu sa epidemiološkim karakteristikama GO. Od svih analiziranih demografskih podataka, jedino je pol bio u značajnoj vezi sa kliničkom prezentacijom GO. Značajno više muškaraca je imalo aktivni i srednje do težak oblik GO, u poređenju sa ženama. Analizirani uzorak pacijenata bio je reprezentativan u odnosu na prirodni tok i epidemiologiju GO. Najveći deo pacijenata imao je primarnu dijagnozu GB, zatim HT, a najmanje pacijenata je imalo eutiroidni oblik GO. Manji broj pacijenata je imao unilateralnu GO. Istraživanjem su obuhvaćeni većinom pacijenti sa blagom i srednje teškom formom GO, dok je udeo aktivnih i neaktivnih oblika GO bio uravnotežen. Dokazana je značajna asocijacija između aktivnosti i težine GO, s obzirom da su vrednosti CAS skora bile značajno veće u grupi ispitanika sa težim kliničkim oblikom bolesti. Dužina trajanja simptoma GO bila je značajno niža kod pacijenata sa aktivnom formom GO, dok sa težinom bolesti nije bila u značajnom odnosu. Vrsta medikamentozne terapije nije bila u značajnoj vezi sa kliničkom formom GO. Rezultati tiroidnih funkcionalnih testova (TSH, FT₄, TPOAt, TGAt) nisu bili značajno povezani sa aktivnošću i težinom GO.

Analizom ukupne koncentracije (TBII), stimulatorne (TSA_b) i blokirajuće funkcionalne aktivnosti TSHRA_t (TBA_b) u serumu različitih grupa pacijenata sa GO utvrđeno je postojanje značajne razlike u serumskim vrednostima TBII, TSA_b i TBA_b u odnosu na primarnu dijagnozu AITB. Serumski nivo TBII i TSA_b bio je značajno viši, a nivo TBA_b značajno niži u grupi pacijenata sa GB u odnosu na pacijente sa HT i eutiroidnim oblikom GO. Značajne razlike u vrednostima TBII, TSA_b i TBA_b između pacijenata sa HT i eutiroidnom GO nije bilo. Dalje je analizirana pozitivnost TSA_b i TBII, odnosno stopa rezultata koji su iznad granične *cut-off* vrednosti koju je definisao proizvođač testa. U ukupnoj analiziranoj populaciji, stimulatorna aktivnost TSA_b je detektovana kod značajno većeg broja pacijenata (93,4%) u odnosu na

koncentraciju TBII koja je detektovana kod ukupno 70,3% pacijenata. Blokirajuća aktivnost antitela TAb je zabeležena samo kod jedne pacijentkinje, kod koje je istovremeno utvrđena i simulatorna aktivnost TSAb. Poređenjem pozitivnosti primenjenih testova uočena je značajno veća stopa pozitivnosti TSAb u odnosu na TBII u grupi pacijenata sa GB i eutiroidnom GO, pri čemu je najistaknutija razlika bila u grupi pacijenata sa eutiroidnim oblikom GO. Daljim ispitivanjem povezanosti TSAb i TBII sa demografskim i kliničkim parametrima od interesa utvrđeno je da su i TSAb i TBII bili značajno povezani sa trajanjem simptoma GO i primenom tiroidne medikamentozne terapije. Trajanje simptoma i serumske vrednosti TSAb i TBII su bili obrnuto proporcionalni. Vrsta tiroidne medikamentozne terapije nije značajno uticala na vrednosti TSAb i TBII. Serumski nivo TSAb bio je značajno veći kod osoba sa pozitivnom porodičnom istorijom AITB, dok se koncentracija TBII u serumu nije značajno razlikovala u odnosu na porodičnu istoriju AITB. Serumske koncentracije TBII i funkcionalne aktivnosti TSAb značajno su negativno korelirale sa serumskom koncentracijom TSH, dok značajna korelacija sa ostalim parametrima tiroidnog statusa nije utvrđena. Nakon što su pacijenti podeljeni prema tiroidnom statusu, stopa pozitivnih rezultata TBII bila je statistički značajno manja u odnosu na TSAb u grupi eutiroidnih ispitanika. Kod hipertiroidnih i hipotiroidnih ispitanika nije bilo statistički značajne razlike u stopi pozitivnih rezultata između testova. Kod jednog dela pacijenata uočeno je istovremeno prisustvo TPOAt i TSAb, kao i TGAt i TSAb.

Daljom analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da su funkcionalna aktivnost TSAb i ukupna koncentracija TBII značajno povezane sa kliničkim profilom GO. Značajno više vrednosti TSAb i TBII su izmerene kod pacijenata sa aktivnom formom GO, u odnosu na pacijente sa neaktivnom GO. Takođe, kod pacijenata sa srednjim do teškim oblikom GO i onih sa GO koja ugrožava vid, dokazane su značajno više vrednosti TSAb i TBII u odnosu na pacijente sa blagom GO. Statistički značajne razlike u nivou TSAb i TBII nije bilo između pacijenata sa uznapređovalim oblikom bolesti (umerena do teška GO i GO koja ugrožava vid). Ispitivanjem prediktivnog potencijala TSHRAAt, utvrđeno je da stimulatorna aktivnost TSAb predstavlja značajan prediktor aktivnosti GO, dok ukupna koncentracija TBII nije pokazala prediktivna svojstva. Iako je raspodela serumske koncentracije i aktivnosti TSHRAAt bila slična u ispitivanim grupama pacijenata, njihova pozitivnost se značajno razlikovala. Kod svih pacijenata sa aktivnim i umerenim do teškim oblikom GO, aktivnost TSAb je bila iznad granice pozitivnosti, dok je pozitivnost ukupne koncentracije TBII bila značajno manja (oko 80%). Najprimetnija razlika u

stopi pozitivnosti TSAb i TBII uočena je u grupi pacijenata sa blažim kliničkim oblikom bolesti (neaktivna i blaga GO). Dodatno su TSAb i TBII identifikovani kao značajni prediktivni markeri razvoja umerene do teške/teške GO koja ugrožava vid, s tim da su vrednosti TSAb predviđale razvoj težih oblika GO sa znatno većem šansom u odnosu na vrednosti koncentracije TBII. Sledeća je analizirana promena aktivnosti i koncentracije TSHRA_t kroz vreme, u odnosu na težinu kliničke prezentacije bolesti. Sa porastom dužine trajanja simptoma GO primetan je značajan pad i nivoa aktivnosti TSAb i koncentracije TBII, koji je višestruko izraženiji u grupi pacijenata sa blagom formom orbitopatije. Međutim, posmatranjem stope pozitivnosti TSAb i TBII, uočeno je da TSAb u ranim fazama bolesti ispoljava podjednaku sposobnost detekcije i blagih i težih oblika GO, dok se značajan pad pozitivnosti u kasnijim fazama bolesti uočava samo kod blage GO. Suprotno, pozitivnost ukupne koncentracije TBII pokazuje značajno niže vrednosti kod blage u odnosu na težu formu GO u ranim fazama bolesti. U kasnijim fazama bolesti, pozitivnost koncentracije TBII se održava relativno istom kod pacijenata sa blagom GO, dok se primećuje značajan pad vrednosti u slučaju težih oblika GO. Ovi rezultati upućuju na zaključak o značajno većoj osetljivosti tehnike bioeseja u ranim fazama blagih oblika GO. Analizom pojedinačnih oftalmoloških parametara utvrđeno je da je serumski nivo aktivnosti TSAb bio značajno povezan sa: prisustvom blagih iritabilnih simptoma GO (suzenje, iritacija, svrab, grebanje, osećaj starnog tela u oku), crvenilom kapaka, crvenilom konjunktiva, inflamacijom plike i karunkule i hemozom. Ukupna serumska koncentracija TBII bila je značajno viša kod pacijenata sa crvenilom konjunktiva, inflamacijom plike i karunkule, hemozom i lagoftalmusom. Statistički značajno veća stopa pozitivnosti rezultata TSAb uočena je kod pacijenata sa sledećim znacima i simptomima GO: retrakcijom kapaka, diplopijama, egzoftalmusom, ograničenjem motiliteta očiju, iritabilnim simptomima očiju, fotofobijom, edemom kapaka i zadebljanjem ekstraokularnih mišića. Dodatno je ispitan i prediktivni potencijal TSAb i TBII za razvoj pojedinačnih znakova i simptoma GO, pri čemu se aktivnost TSAb izdvojila kao značajan prediktivni marker hemoze, inflamacije plike i karunkule, crvenila konjunktiva, simptoma iritacije očiju i retrobularnog bola, dok ukupna serumska koncentracija TBII nije pokazala značajan prediktivni potencijal u ovom smislu.

Imunohemijska CLIA metode (IMMULITE® 2000 TSI) za određivanje koncentracije TSHRA_t je uspešno verifikovana i svi izračunati parametri preciznosti metode su odgovarali opštem minimum analitičkih karakteristika laboratorijskih metoda, definisanim vrednostima

proizvođača i smernicama FDA (*engl. Food and Drug Administration*) vodiča. Tačnost metode je određena uporednom analizom uzoraka na dva različita imunoanalizatora, poređenjem sa kompetitivnom imunohemijskom metodom za određivanje ukupne koncentracije TSHRA_t (Elecsys Anti-TSHR). Izračunat je statistički značajan koeficijent korelacije što ukazuje na to da su analizirane metode bile u značajnom linearnom odnosu. Daljim ispitivanjem uporedivosti metoda detektovano je statistički značajno, konstantno odstupanje dobijenih rezultata. Ispitivanjem dijagnostičke tačnosti ove metode za postavljanje dijagnoze GO, utvrđeno je da metoda IMMULITE® 2000 TSI poseduje zadovoljavajuće dijagnostičke karakteristike (osetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost), odnosno odličnu diskriminatornu sposobnost razlikovanja bolesne od zdrave populacije.

Komparativnom analizom dijagnostičkih karakteristika tri laboratorijske metode za određivanje TSHRA_t (tehniku bioeseja, rutinska kompetitivna imunohemijska ECLIA metoda i imunohemijska CLIA metoda) utvrđeno je da TSA_b bioesej ispoljava najveću stopu osetljivosti za detekciju GO. U celokupnoj ispitivanoj populaciji pacijenata, rezultati TSA_b bioeseja značajno su se razlikovali u odnosu na kompetitivnu rutinsku metodu, kao i u odnosu na CLIA imunohemijsku metodu. Nije bilo značajnog odstupanja rezultata ispitivanih imunohemijskih testova. Zatim su analizirane stope kliničke osetljivosti primenjenih testova u odnosu na aktivnost i težinu GO, trajanje simptoma GO i stepen stimulatorne aktivnosti TSA_b. Uočava se opšti trend veće osetljivosti tehnike bioeseja u svim analiziranim grupama pacijenata. Osetljivost i negativna prediktivna vrednost (NPV) TSA_b bioeseja za detekciju aktivnog i umerenog i teškog oblika GO iznosio je 100%, što ukazuje na bolju diskriminatornu sposobnost tehnike bioeseja da prepozna komplikovaniji klinički tok bolesti koji zahteva lečenje. Interesantno je, međutim, da je najuočljivija razlika u osetljivosti analiziranih laboratorijskih metoda bila kod blažeg kliničkog toka bolesti, niske stope aktivnosti i težine, dužeg trajanja i niskog stepena stimulatorne aktivnosti TSA_b. Dijagnostičke karakteristike nove CLIA imunohemijske metode nisu bile značajno naprednije u odnosu na tradicionalnu kompetitivnu imunohemijsku metodu. Razlika u kliničkim karakteristikama analiziranih metoda bila je naročito uočljiva kod pacijenata sa eutiroidnom GO, kod kojih je tehnika TSA_b bioeseja uspešno detektovala 87,5% pacijenata, CLIA imunohemijski test 62,5% i ECLIA kompetitivni imunoesej 12,5%. Korelaciona analiza dobijenih rezultata pokazala je da najbolje koreliraju rezultati dobijeni imunohemijskim metodama, što je i očekivano s obzirom na sličan princip merenja analita.

Prilikom ispitivanja značaja određivanja nivoa interleukina u uzorcima pacijenata sa GO, primarno je analizirana njihova raspodela u odnosu na demografske i kliničke karakteristike pacijenata. Demografske karakteristike ispitivane populacije nisu bile u značajnom odnosu sa ispitivanim interleukinima. Izuzetak je bila serumska koncentracija IL-8 koja je bila značajno veća u populaciji žena nego muškaraca. Nivo IL-1 β u serumu bio je značajno viši, a nivo IL-1RA granično niži kod pacijenata sa aktivnim oblikom GO u odnosu na one sa neaktivnom GO. Serumski nivo IL-1 β je takođe pozitivno korelirao sa vrednostima CAS skora. Niža koncentracija IL-1RA u serumu je bila prisutna kod pacijenata sa skorijom pojavom simptoma GO što je u skladu sa aktivnom, inflamatornom fazom bolesti. Teži oblik GO bio je prisutan kod pacijenata sa značajno višim koncentracijama IL-6 u serumu. Izmerena koncentracija IL-6 u serumu bila je takođe značajno povezana i sa vrstom AITB. Serumski aktivnost i koncentracija TSHRAt značajno su korelirale sa IL-6, dok sa IL-1RA, IL-1 β i IL-8 nisu bile u značajnoj korelaciji.

Analizom parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (TOS, TAS, OSI i 8-OHdG) u ovoj populaciji pacijenata, utvrđeno je da je serumski koncentracija TAS bila značajno povezana sa težinom GO. Naime, sa povećanjem težine GO, povećavala se i koncentracija TAS u serumu pacijenata. Dodatno, serumski nivoi TAS bili su značajno povezani sa pojedinim oftalmološkim parametrima od značaja (ograničenje motiliteta ekstraokularnih mišića, fibroza ekstraokularnih mišića i poremećaj funkcije vida). Korelacionom analizom je utvrđeno da je postojala pozitivna korelacija serumskog nivoa TAS sa stimulatornom aktivnošću TSAb u serumu pacijenata. Nivo 8-OHdG u plazmi pacijenata nije bio značajno povezan ni sa jednim od demografskih, niti kliničkih parametara u ovoj studiji. Dodatno, nivoi 8-OHdG nisu značajno korelirali sa serumskom aktivnošću, niti koncentracijom TSHRAt pacijenata.

Na kraju ovog rada ispitan je potencijal multiparametarskih modela za predviđanje razvoja teže kliničke slike bolesti. U tu svrhu je urađena ROC analiza kojom je ispitana dijagnostička tačnost stimulatorne aktivnosti TSAb i multimarker modela za predikciju aktivnosti i težine GO. Međusobnim poređenjem dve ROC krive za pojedinačnu upotrebu TSAb i za multiparametarski model dobijena je statistički značajna razlika, odnosno utvrđeno je da multiparametarski model značajno povećava sposobnost predviđanja razvoja aktivnog oblika GO. U slučaju težine GO, nije dokazana statistički značajna razlika u slučaju samostalne upotrebe TSHRAt kao parametra GO i multiparametarskih modela.

C. Uporedna analiza rezultata iz doktorske disertacije sa podacima iz literature

Graves-ova oftalmopatija/orbitopatija (GO) predstavlja specifičan autoimuni poremećaj orbite koji se primarno javlja u sklopu Graves-ove bolesti (GB). Bliska epidemiološka i klinička povezanost ove dve patologije čine osnovnu hipotezu o njihovoj zajedničkoj etiološkoj i patofiziološkoj osnovi (2). Osim u sklopu GB, GO se u 10% slučajeva razvija kod pacijenata sa Hašimoto tiroiditisom (HT) i eutiroidnim oblikom GO (1). Prema aktuelnim epidemiološkim podacima, opšta prevalencija GO u Evropi iznosi između 90 i 155 ljudi u populaciji od 100000, a godišnja incidencija GO u SAD je 16 žena i 3 muškarca na 100000 osoba (3, 4). Međutim, subklinički oblici ove bolesti su daleko češći, što se može uočiti primenom naprednih tehnika vizuelizacije kao suptilno uvećanje ekstraokularnih mišića orbite (5). Iako najnoviji epidemiološki podaci ukazuju na smanjenje prevalencije GO u opštoj populaciji, ona i dalje u velikom stepenu narušava funkciju vida i estetiku lica, značajno remeti svakodnevni život, psihosocijalnu i radnu sposobnost pacijenata (6, 7). Problematika ove patologije je višestruka. Teški oblici GO mogu dovesti do potpunog gubitka vida usled razvoja distiroidne optičke neuropatije, dok blage i nespecifične kliničke varijante bolesti mogu proći neopaženo godinama, bez tačne dijagnoze i adekvatne terapije (1, 8, 9). Drugi problem je nepredvidljiv klinički tok GO. Još uvek je nemoguće sa sigurnošću izdvojiti pacijente sa GB kod kojih će se javiti GO. Graves-ova orbitopatija je bolest hroničnog karaktera, sa periodima remisije i relapsa. Iako se bolest spontano povlači kod jednog dela pacijenata, često perzistiraju hronične funkcionalne promene ekstraokularnih mišića, a kompletan oporavak se retko postiže (3, 8). Takođe, kod otprilike jedne trećine pacijenata izostaje adekvatan terapijski odgovor (8). Jedan od glavnih kliničkih problema ove patologije je veliki stepen subjektivnosti kliničke procene GO (10). Dijagnostika i praćenje ovih pacijenata se izvode u visoko specijalizovanim, referentnim centrima tercijarne zdravstvene zaštite, pri čemu je obično neophodna višednevna hospitalizacija pacijenta i primena mnogobrojnih dijagnostičkih procedura. Sve navedeno ukazuje na neophodnost uvođenja neinvazivnih seroloških biomarkera GO, visoke osetljivosti i specifičnosti, koji bi se koristili za postavljanje dijagnoze, optimizaciju terapije, praćenje pacijenata i prognozu toka bolesti.

Smatra se da je GO bolest multifaktorske prirode koja nastaje kao rezultat međusobne interakcije endogenih i egzogenih faktora. Kompleksni mehanizmi njihove interakcije nisu u potpunosti poznati, zbog čega je izuzetno važno prepoznati sve potencijalne faktore uticaja, a naročito kontrolisati faktore sredine u cilju prevencije i usporavanja progresije bolesti (3, 11). U

ovoj disertaciji su prvo analizirane demografske i antropometrijske karakteristike ispitivane populacije u cilju analize potencijalnih faktora rizika nastanka i progresije GO, kao i njihove povezanosti sa kliničkim fenotipom GO. Prethodno su starija životna dob i muški pol prepoznati kao značajni faktori koji povećavaju verovatnoću za nastanak teških oblika GO (11, 12). U ovoj disertaciji je muški pol bio povezan sa lošijim ishodom bolesti i imao značajan samostalan prediktivni potencijal za razvoj aktivne GO. Godine starosi nisu bile značajno povezane sa vrstom AITB, niti sa kliničkom slikom GO u ovom radu. Potencijalan uzrok ovakvog rezultata je to što je većina pacijenata bila srednje životne dobi. Izloženost duvanskom dimu je u prethodnim istraživanjima prepoznata kao značajan dozno-zavistan faktor rizika za razvoj GO (13). Pušačke navike u ovoj studiji nisu bile značajno povezane sa kliničkim profilom GO, niti sa titrom TSHRA_t u serumu pacijenata, što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja izvedenih u našoj populaciji (14). Pozitivna porodična istorija AITB bila je značajno povezana sa vrednostima TSA_b, što bi moglo da ukaže na potencijalnu prognostičku vrednost TSA_b. Ostali demografski parametri nisu bili značajno povezani sa oblikom GO, niti sa TSHRA_t.

Klinički podaci ispitivanih pacijenata u ovom istraživanju su bili u skladu sa aktuelnim epidemiološkim podacima (3). Trajanje simptoma bilo je obrnuto proporcionalno aktivnosti GO i serumskim nivoima TSHRA_t. Dobijeni rezultati su u skladu sa prirodnim tokom GO u kome inflamatorni simptomi koji definišu aktivnost GO prethode hroničnim promenama koje definišu težinu GO (15).

Sledeći su ispitani uticaj medikamentozne terapije i suplementacije selenom na kliničku sliku GO i serumski nivo TSHRA_t. Iako je prethodno prepoznato pozitivno imunomodulatorno i antioksidativno dejstvo selena na ovu populaciju pacijenata, zbog čega je šestomesečna primena preparata selena uvrštena u kliničke vodiče lečenja blagih oblika GO (16), u ovom istraživanju primena selena nije bila značajno povezana ni sa kliničkim oblikom GO, niti sa titrom TSHRA_t. Serumski nivo TSHRA_t bio je značajno viši kod pacijenata koji su bili na tiroidnoj medikamentoznoj terapiji (antitiroidni lekovi/levotiroksin) u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji. Trajanje antitiroidne terapije je bilo u negativnoj korelaciji sa titrom TSHRA_t, što se može objasniti pozitivnim imunomodulatornim efektima ovih lekova koji dovode do smanjenja autoreaktivnih antitela, zajedno sa postizanjem ravnoteže tiroidnih hormona (17).

U ovoj disertaciji je utvrđeno postojanje značajne razlike u nivoima ukupne koncentracije (TBII) i funkcionalne aktivnosti TSHRA_t (TSA_b i TBA_b) u serumu pacijenata sa GB, HT i eutiroidnom GO. Prevalencija i nivo TSHRA_t bili su najveći kod pacijenata sa GB, što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja i navodi na zaključak da je TSHRA_t specifičan biomarker GB i njenih ekstratiroidnih manifestacija (18). Daljim ispitivanjem pozitivnosti rezultata određivanja TSA_b, TBA_b i TBII, utvrđeno je da je stimulatorna frakcija TSHRA_t bila najprevalentnija u analiziranoj populaciji pacijenata, što upućuje na prednost funkcionalne aktivnosti TSHRA_t u postavljanju dijagnoze GO. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija i ukazuju na bolju diskriminatornu sposobnost TSA_b u prepoznavanju individualne predispozicije za razvoj orbitalnih simptoma bolesti. U istraživanju Khoo i saradnika (19) utvrđeno je da je GO u direktno proporcionalnom odnosu sa prevalencijom TSA_b, ali ne i sa TBII. Noh i saradnici (20) su takođe istakli prednost stimulatorne aktivnosti ovih antitela za detekciju orbitalnih manifestacija AITB, dok je ukupna koncentracija TSHRA_t prepoznata kao značajan marker tiroidne funkcije. Stimulatorna antitela su dominantna kod pacijenata sa GB i GO, i smatraju se direktnim pokretačima patogenetskih mehanizama ovih poremećaja (18). Incidencija blokirajućih antitela kod GO i AITB je daleko manje uobičajena, a obično je povezana sa stanjem hipotiroidizma i eutiroidizma. Međutim, kod jednog dela pacijenata sa GB mogu se detektovati TBA_b, naročito nakon antitiroidne terapije ili tretmana radioaktivnim jodom (21). U ovom istraživanju je blokirajuća aktivnost TSHRA_t zabeležena kod jedne pacijentkinje kod koje je istovremeno detektovana stimulatorna aktivnost ovih autoreaktivnih antitela. Prethodno je potvrđeno da stimulatorna i blokirajuća funkcionalna aktivnost TSHRA_t mogu biti istovremeno prisutne kod istog pacijenta, a moguća objašnjenja ovog fenomena su fluktuacija tiroidnog statusa i aktivnosti GO (22). Potencijalni uzroci prelaska stimulatorne u blokirajuću aktivnost TSHRA_t su varijabilni afinitet, potentnost i koncentracija ovih antitela (23). Naročito se u ovakvim slučajevima ističe prednost tehnike bioeseja i zasebnog merenja funkcionalne aktivnosti TSHRA_t, kako bi se detektovale fine promene u stanju autoimunosti, tiroidnog statusa, te u skladu sa tim saznanjima optimizovala terapija GO i AITB.

Posebno mesto u ovoj disertaciji je posvećeno ispitivanju kliničkog značaja TSHRA_t kao biomarkera koji odražavaju varijabilnost kliničkog fenotipa GO. U ovom smislu je pre svega analizirana povezanost TSHRA_t sa aktivnošću i težinom GO, kao i sa pojedinačnim oftalmološkim znacima i simptomima bolesti. Kod pacijenata sa aktivnom, kao i onih sa

umerenom do teškom i GO koja ugrožava vid, izmereni su značajno veći nivoi TSAb i TBII. Iako su i funkcionalna aktivnost i koncentracija TSHRAAt bili značajno povezani sa aktivnošću i težinom u ovoj studiji, uviđa se značajna razlika u pozitivnosti njihovih rezultata merenja. Vrednost TSAb bila je iznad granice pozitivnosti kod svih pacijenata sa aktivnom i umerenom i teškom GO što navodi na zaključak da tehnika bioeseja ima prednost kada je u pitanju identifikacija pacijenata sa komplikovanijim kliničkim tokom bolesti kod kojih je neophodna primena terapije ili hirurških procedura. Ovakva zapažanja su usklađena sa rezultatima prethodnih istraživanja koja ističu prednost stimulatorne aktivnosti TSHRAAt kada je u pitanju predviđanje i korelacija sa kliničkim manifestacijama GO (24). Važan deo istraživanja odnosio se na ispitivanje prediktivnih karakteristika TSHRAAt s obzirom na to da trenutno ne postoji definitivan marker, adekvatnog prediktivnog i prognostičkog potencijala, koji bi kliničarima olakšao donošenje kliničkih odluka i optimizaciju terapije (25). Rezultati ove disertacije potvrđuju da je serumski nivo TSAb nezavistan prediktivni marker razvoja aktivnog oblika GO, dok serumska koncentracija TBII nije pokazivala prediktivnu sposobnost u odnosu na aktivnost GO. Serumski nivoi TSAb i TBII bili su značajni prediktivni marker težine GO, s tim što je prediktivna vrednost TSAb bila znatno veća. Prethodno je samo TSAb prepoznat kao prognostički parametar oftalmopatije, dok koncentracija TBII nije imala slične karakteristike (19). Ovakvi rezultati ukazuju na klinički značaj funkcionalnog karaktera TSHRAAt u predviđanju kliničkog toka GO. U studiji Eckstein i saradnika (25), tehnika bioeseja pokazala je značajno bolju sposobnost predikcije finih razlika u težini GO koje se uočavaju u toku dužeg vremenskog perioda. Važan rezultat ove disertacije je da je, u ranim fazama GO, tehnika bioeseja imala visoku stopu pozitivnosti i kod blagih formi bolesti, dok je pad pozitivnosti bio izražen u slučaju dužeg trajanja simptoma. Suprotno TSAb, ukupna koncentracija TBII nije pokazivala ovakvu raspodelu stope pozitivnosti, zbog čega se samo TSAb nameće kao kandidat za predviđanje razvoja težih oblika bolesti u dužem vremenskom periodu.

Sledeća je ispitana povezanost TSHRAAt sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima GO koji ulaze u bodovne sisteme aktivnosti i težine GO, kako bi se detaljnije ispitaio varijabilan klinički fenotip ove patologije i pojedinačna priroda veze svakog od ovih parametara sa TSHRAAt. Prethodno je utvrđeno da je nivo TSAb, ali ne i TBII, usko povezan sa glavnim parametrima GO (uvećanje mišića oka, orbitalna adipogeneza i oticanje kapaka) (20). Fenotipske razlike GO potiču od više faktora, pre svega interindividualnih varijacija u anatomskoj građi orbite i

fenotipskih varijacija orbitalnih fibroblasta. Tačni mehanizmi koji definišu fenotip ovih ćelija i njihovu predispoziciju za dominantnu adipogenezu ili fibrozu nisu u potpunosti poznati i smatra se da su u osnovi heterogene prezentacije GO (10, 26). I pored velikih napora koji su uloženi u pogledu standardizacije kliničke evaluacije GO, i dalje postoji visoka stopa subjektivnosti kliničke procene i percepcije simptoma bolesti. Iz ovih razloga postoji velika potreba za uvođenjem objektivnih metoda i biomarkera direktno merljivih u uzorcima pacijenata sa GO (27). Rezultati ove disertacije potvrđuju hipotezu o uskoj povezanosti serumskih nivoa TSHRA_t sa pojedinačnim oftalmološkim parametrima. Prevalencija stimulatorne aktivnosti TSA_b bila je značajno veća u odnosu na TBII kod pacijenata sa: retrakcijom kapaka, iritabilnim simptomima, fotofobijom, diplopijama, proptozom, uvećanim ekstraokularnim mišićima i ograničenom pokretljivošću očiju. Stimulatorna aktivnost TSA_b prepoznata je i kao značajan prediktivni marker pojave iritabilnih simptoma očiju, hemoze, inflamacije plike i karunkule, crvenila konjunktiva i retrobulbarnog bola, za razliku od nivoa TBII.

Naročit fokus ove disertacije bila je analiza različitih testova za određivanje TSHRA_t, odnosno njihove funkcionalne aktivnosti i ukupne koncentracije kao zasebnih parametara za praćenje kliničkog toka GO. Međusobnim poređenjem dijagnostičkih karakteristika primenjenih analitičkih metoda utvrđeno je da tehnika bioeseja ima najbolje karakteristike, pre svega po pitanju dijagnostičke osetljivosti, u odnosu na obe vrste primenjenih imunohemijskih metoda. Osetljivost tehnike bioeseja bila je 100% u slučaju aktivne ili umerene/teške GO, međutim najizraženija razlika u osetljivosti metoda bila je kod pacijenata sa blagim manifestacijama bolesti (neaktivna, blaga GO, biohemijski eutiroidizam, eutiroidna GO, duže trajanje simptoma GO). Osim visoke stope kliničke osetljivosti tehnike bioeseja, prethodno je u studijama serijskih razblaženja pokazana i visoka analitička osetljivost ove metode (28).

Razlike u kliničkim performansama primenjenih metoda se objašnjavaju različitim analitičkim dizajnom i vrstom TSH receptora koji se koristi (29, 30, 31). Na TSH receptoru, vezujuća mesta za TSA_b i TBA_b su fizički u neposrednoj blizini, zbog čega je analitička specifičnost testova koji koriste princip vezivanja receptora upitna (32). Rutinski imunohemijski testovi mere ukupnu koncentraciju TSHRA_t, odnosno zbir stimulatornih, blokirajućih i neutralnih antitela. Tehnikom bioeseja direktno se meri stvaranje cAMP-a (ciklični adenzin-monofosfat) i time funkcionalna aktivnost antitela koja definiše klinički tok GB i GO (33).

U ovoj disertaciji je najistaknutija razlika u stopi pozitivnosti laboratorijskih metoda za određivanje TSHRA_t detektovana kod pacijenata sa eutiroidnim oblikom GO, kod kojih su tehnikom bioeseja detektovani gotovo svi pacijenti, dok je sposobnost tradicionalnog imunohemijskog određivanja da identifikuje ove pacijente bila znatno ograničena. Ovaj rezultat je od izuzetnog kliničkog značaja, s obzirom na složenost diferencijalne dijagnostike eutiroidne GO koja predstavlja poseban klinički izazov. Za razliku od pacijenata sa GB ili HT gde se poremećaji orbite primarno dovode u vezu sa štitnom žlezdom, u ovoj grupi pacijenata poreklo oftamoloških simptoma nije jasno. Njihovi klinički simptomi su nespecifični, sa visokim stepenom preklapanja sa drugim inflamatornim oftalmološkim stanjima. Diferencijalna dijagnoza eutiroidne GO se zato u potpunosti oslanja na laboratorijsku dijagnostiku bolesti, zbog čega je neophodno koristiti testove visoke osetljivosti (9).

Na osnovu ovih rezultata može se izvesti zaključak da jedino tehnika bioeseja može da zameni tradicionalne rutinske testove i da bi integracija ove metode u dijagnostičke algoritme mogla značajno unaprediti klinički menadžment GO.

Citokini zauzimaju centralno mesto u interakciji metaboličkih puteva inflamacije u GO. Oni predstavljaju važan domen istraživanja autoimunih bolesti, ne samo sa aspekta proučavanja patogeneze ovih bolesti, već i razvoja novih vidova terapije (34, 35). Citokinski profil pacijenata analiziranih u ovoj studiji bio je u značajnoj vezi sa kliničkim oblikom GO. Serumske koncentracije IL-6 bile su značajno povezane sa težinom GO, dok su koncentracije IL-1 β i IL-1RA bile u značajnoj asocijaciji sa aktivnošću GO. Dodatno je uočena značajna pozitivna korelacija serumskih nivoa TSHRA_t i IL-6, što ukazuje na potencijalan značaj zajedničke primene ovih parametara.

Studije su pokazale da se narušavanje oksidoredukcionog balansa može odraziti na kliničku sliku GO (36). Lu i saradnici (37) su dokazali da katalaza i SOD (superoksid-dismutaza), na nivou orbitalnih fibroblasta, smanjuju akumulaciju glikozaminoglikana koji su glavno histološko obeležje GO. Rezultati ove disertacije potvrđuju iznetu hipotezu, potvrdom da su serumski nivoi TAS bili značajno povezani sa težinom GO i stimulatornom aktivnosti TSA_b u serumu ispitivanih pacijenata. Ova saznanja bi se mogla iskoristiti u cilju unapređenja laboratorijske dijagnostike, terapijskih mogućnosti i prevencije ove bolesti.

U ovom istraživanju izmerene su donekle neočekivane vrednosti 8-OHdG. U studiji Tsai i saradnika (38), 8-OHdG je na nivou orbitalnih fibroblasta značajno korelirao sa titrom TSHRA_t, dok su urinarne koncentracije bile povezane sa aktivnošću i težinom GO. Prethodno je pokazana višestruka vrednost određivanja ovog parametra oksidativnog oštećenja DNK kod pacijenata sa GB i GO (36, 38, 39). U ovom istraživanju, koncentracije 8-OHdG u plazmi nisu bile značajno povezane sa kliničkim profilom GO, niti sa aktivnošću i koncentracijom TSHRA_t. Potencijalno objašnjenje kontradiktornosti dobijenih rezultata je to da je ovaj parametar izmeren u uzorcima plazme pacijenata, dok su prethodna istraživanja uglavnom podrazumevala određivanje 8-OHdG u kulturama orbitalnih fibroblasta ili uzorcima urina. Uzorci plazme sadrže kompleks slobodnog 8-OHdG i 8-OHdG inkorporiranog u DNK molekul. Slobodan 8-OHdG se koncentriše u bubrezima i izlučuje urinom, zbog čega se u urinu kvantifikuje samo slobodna forma ovog analita (40). Drugi potencijalni razlog neslaganja rezultata je analitičke prirode i posledica je metodoloških razlika i nedostatka uniformnih referentnih intervala (41).

Finalnom ROC analizom multiparametarskog modela koji je obuhvatao sve analizirane biomarkere u ovoj disertaciji utvrđeno je da ovakvi modeli pokazuju prednost u predviđanju kliničkog toka GO u odnosu na pojedinačne biomarkere. Ovakav zaključak usmerava buduća istraživanja i klinički pristup menadžmenta ove bolesti ka multidisciplinarnosti i uvođenju složenih dijagnostičkih algoritama u kliničku praksu.

D. Provera originalnosti doktorske disertacije

Provera originalnosti ove disertacije izvršena je na način koji je propisan Pravilnikom o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

Program *iThenticate* je registrovao ukupno 8% poklapanja sa 267 izvora. Preklapanje teksta sa svim registrovanim izvorima iznosio je manje od 1%. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je podudarnost teksta posledica korišćenja naziva određivanih analita, ličnih imena ili naziva stručnih organizacija, naziva reagenasa i primenjenih analitičkih i statističkih metoda, opštih termina korišćenih za opis rezultata, kao i istih referenci i objavljenih radova kandidata.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Marije Sarić Matutinović u potpunosti originalna, kao i da su poštovana akademska pravila citiranja.

E. Zaključak- obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Graves-ova orbitopatija predstavlja nedovoljno istraženu patologiju koja do danas ostaje patofiziološka i terapijska enigma (1). Aktuelni pristup kliničkom menadžmentu ove bolesti oslanja se na kliničku evaluaciju znakova i simptoma bolesti koja zahteva visoko specijalizovane kliničare i kontinuirano praćenje pacijenata u referentnim centrima tercijarne zdravstvene zaštite (4, 8, 10). I pored uvođenja standardnih dijagnostičkih protokola i dalje se klinička procena GO bazira u velikom stepenu na subjektivnom pristupu zbog čega postoji velika potreba za uvođenjem objektivnih dijagnostičkih metoda i unapređenjem laboratorijske dijagnostike GO (10, 27). Takođe postoji problem nestandardizovanih tehnika merenja pojedinih oftalmoloških parametara, visok stepen interindividualne varijacije i nedostatak populaciono specifičnih referentnih intervala (10, 42). Imajući u vidu ozbiljnost trajnih funkcionalnih posledica GO, kao i značajan uticaj na svakodnevni život pacijenata, imperativ je otkriće novih biomarkera i njihova implementacija u kliničku praksu.

Otkriće familije autoreaktivnih TSHRA_t otvorilo je novu stranu izučavanja i razumevanja etiologije AITB i njihovih ekstratiroidnih manifestacija. Utvrđeno je da ovu heterogenu klasu antitela karakteriše varijabilni funkcionalni karakter, te da se u serumu pacijenata sa AITB mogu istovremeno naći antitela različite biološke aktivnosti (43). Postoje tri vrste TSHRA_t: stimulatorna za koja se smatra da izazivaju hipertiroidizam na nivou štitne žlezde i orbitopatiju na nivou orbite, blokirajuća koja izazivaju hipotiroidizam na nivou štitne žlezde i neutralna čija tačna funkcija do danas nije razjašnjena (44). Danas se u rutinskim uslovima, primenom imunohemijskih metoda, može odrediti samo ukupna koncentracija ovih antitela, čime se ne stiče uvid u njihov funkcionalni karakter. Ovi testovi se obično navode kao rutinske ili tradicionalne metode. Funkcionalnost TSHRA_t se može izmeriti primenom bioloških testova, međutim ove metode još uvek nisu ušle u rutinsku upotrebu i uglavnom se koriste u istraživačke svrhe (33, 45).

Zaključci izvedeni na osnovu rezultata ove disertacije ukazuju na izuzetan klinički značaj TSHRA_t kao biomarkera GO. Dobijeni rezultati potvrđuju ranije postavljene hipoteze o značajnom dijagnostičkom, prediktivnom i prognostičkom potencijalu ovog parametra, te da se može koristiti za dijagnostiku GO, predikciju njenog kliničkog toka i adekvatnu stratifikaciju pacijenata. Na osnovu analize koncentracije i aktivnosti TSHRA_t u ispitivanoj populaciji pacijenata, zaključci ove disertacije ukazuju na to da je TSHRA_t specifičan biomarker GB, te da

dobro korelira sa tiroidnim statusom i kliničkim parametrima GO. Naročito se ističe vrednost TSHRA_t kao biomarkera aktivnosti i težine GO. Poseban dijagnostički potencijal je pokazao funkcionalni profil TSHRA_t koji je ovde po prvi put analiziran u našoj populaciji. Zaključci izvedeni na osnovu rezultata komparativne analize dijagnostičke tačnosti različitih laboratorijskih metoda za određivanje TSHRA_t potvrđuju višestruku prednost tehnike bioeseja pre svega po pitanju dijagnostičke osetljivosti. Najistaknutija prednost po pitanju osetljivosti ove metode bila je uočljiva u grupi pacijenata sa eutiroidnim oblikom GO, iz čega se može zaključiti da je funkcionalna aktivnost TSHRA_t najbolja opcija u slučaju komplikovane diferencijalne dijagnoze bolesti. Utvrđeno je da tehnika bioeseja ima najoptimalnije kliničke performanse, te da predstavlja adekvatnu alternativu postojećim laboratorijskim testovima. Kao takva, ova metoda bi značajno unapredila rutinsku kliničku praksu i otvorila put ka personalizovanom pristupu lečenja pacijenata. Dodatno je ovom studijom obuhvaćena analiza citokinskog profila i oksidativnog statusa organizma, pri čemu je zaključeno da su serumski nivoi IL-6, IL-1 β , IL-1RA i TAS bili značajno povezani sa kliničkom slikom GO. Dodatno je ispitan i njihov odnos sa TSHRA_t u ovoj populaciji pacijenata i utvrđeno je da su IL-6 i TAS značajno korelirali sa TSHRA_t. Konačno, rezultati ove disertacije upućuju na mogućnost razvoja novih multiparametarskih modela koji bi obuhvatali veći broj biomarkera, a u cilju poboljšanja laboratorijske dijagnostike kao jednog od najznačajnijih alata u medicinskoj dijagnostici GO.

Literatura:

1. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2010;362:726–38.
2. Wiersinga WM, Smit T, van der Gaag R, Koornneef L. Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and onset of thyroidal Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 1988;11:615–9.
3. Bartalena L, Piantanida E, Gallo D, Lai A, Tanda ML. Epidemiology, natural history, risk factors, and prevention of Graves' orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:615993.
4. Perros P, Hegedus L, Bartalena L, Marcocci C, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis* 2017;12:72.

5. Villadolid MC, Yokoyama N, Izumi M, et al. Untreated Graves' disease patients without clinical ophthalmopathy demonstrate a high frequency of extraocular muscle (EOM) enlargement by magnetic resonance. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2830–3.
6. Ippolito S, Cusini C, Lasalvia P, Gianfagna F, Veronesi G, Gallo D, et al. Change in newly diagnosed Graves' disease phenotype between the twentieth and the twenty-first centuries: meta-analysis and meta-regression. *J Endocrinol Invest* 2021;44:1707–18.
7. Bruscolini A et al. Quality of life and neuropsychiatric disorders in patients with Graves' Orbitopathy: Current concepts. *Autoimmun Rev* 2018;17:639–43.
8. Kotwal A, Stan M. Thyrotropin receptor antibodies-an overview. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2018;34:S20–7.
9. Marinò M, Ionni I, Lanzolla G, Sframeli A, Latrofa F, Rocchi R, Marcocci C. Orbital diseases mimicking graves' orbitopathy: a long-standing challenge in differential diagnosis. *J Endocrinol Invest* 2020;43:401–11.
10. Dickinson AJ, Perros P. Controversies in the clinical evaluation of active thyroid-associated orbitopathy: use of a detailed protocol with comparative photographs for objective assessment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:283–303.
11. Cao J, Su Y, Chen Z, Ma C, Xiong W. The risk factors for Graves' ophthalmopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2022;260:1043–54.
12. Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Panicucci M, Pinchera A: Studies on the occurrence of ophthalmopathy in Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;120:473–8.
13. Wiersinga W, Žarković M, Bartalena L, Donati S, Perros P, Okosieme O, et al; EUGOGO (European Group on Graves' Orbitopathy). Predictive score for the development or progression of Graves' orbitopathy in patients with newly diagnosed Graves' hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol* 2018;178:635–43.
14. Nedeljkovic Beleslin B, Ciric J, Stojkovic M, et al. Comparison of efficacy and safety of parenteral versus parenteral and oral glucocorticoid therapy in Graves' orbitopathy. *Int J Clin Pract* 2020;74:e13608.
15. Kendall-Taylor P. Natural history. Wiersinga WM, Kahaly GJ. Graves' orbitopathy (eds): A multidisciplinary approach. Karger, Basel 2007;78–87.

16. Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C. The 2021 European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *Eur J Endocrinol* 2021;185:G43–67.
17. Volpe R. Evidence that the immunosuppressive effects of antithyroid drugs are mediated through actions on the thyroid cell, modulating thyrocyte-immunocyte signaling: a review. *Thyroid* 1994;4:217–23.
18. Kahaly GJ, Diana T, Olivo PD. TSH receptor antibodies: relevance & utility. *Endocr Pract* 2020;26:97–106.
19. Khoo DH, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Tai ES, Chee SP et al. The combination of absent thyroid peroxidase antibodies and high thyroid-stimulating immunoglobulin levels in Graves' disease identifies a group at markedly increased risk of ophthalmopathy. *Thyroid* 1999;9:1175–80.
20. Noh JY, Hamada N, Inoue Y, Abe Y, Ito K, Ito K. Thyroid-stimulating antibody is related to Graves' ophthalmopathy, but thyrotropin-binding inhibitor immunoglobulin is related to hyperthyroidism in patients with Graves' disease. *Thyroid* 2000;10:809–13.
21. Diana T, Krause J, Olivo PD, Konig J, Kanitz M, Decallonne B, Kahaly GJ. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2017;189:304–9.
22. Evans M, Sanders J, Tagami T, Sanders P, Young S, Roberts E et al. Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;73:404–12.
23. McLachlan SM, Rapoport B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid* 2013;23:14–24.
24. Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, Matheis N, Kohn LD, Kahaly GJ. A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2123–31.
25. Eckstein AK, Plicht M, Lax H, Neuhäuser M, Mann K, Lederbogen S, et al. Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3464–70.

26. Smith TJ. TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:171–81.
27. Mourits MP. Diagnosis and differential diagnosis of Graves' orbitopathy. Wiersinga WM, Kahaly GJ (eds): *Graves' Orbitopathy: A Multidisciplinary Approach*. Karger, Basel, 2007;66–76.
28. Kahaly GJ, Wüster C, Olivo PD, Diana T. High titers of thyrotropin receptor antibodies are associated with orbitopathy in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:2561–8.
29. Diana T, Wuster C, Olivo PD et al. Performance and specificity of 6 immunoassays for tsh receptor antibodies: A multicenter study. *Eur Thyroid J* 2017;6:243–9.
30. Allelein S, Diana T, Ehlers M, Kanitz M, Hermsen D, Schott M, et al. Comparison of a bridge immunoassay with two bioassays for thyrotropin receptor antibody detection and differentiation. *Horm Metab Res* 2019;51:341–46.
31. Diana T, Holthoff HP, Fassbender J, Wüster C, Kanitz M, Kahaly GJ, Ungerer M. A novel long-term Graves' disease animal model confirmed by functional thyrotropin receptor antibodies. *Eur Thyroid J* 2020;9:51–8.
32. Tahara K, Ishikawa N, Yamamoto K, Hirai A, Ito K, Tamura Y, Yoshida S, Saito Y, Kohn LD. Epitopes for thyroid stimulating and blocking autoantibodies on the extracellular domain of the human thyrotropin receptor. *Thyroid* 1997;7:867–77.
33. Lytton SD, Schluter A, Banga PJ. Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: bioassays prevail over binding assays. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018;23:2028–43.
34. Bahn RS. Cytokines in thyroid eye disease: potential for anticytokine therapy. *Thyroid* 1998;8:415–8.
35. Łacheta D, Miśkiewicz P, Głuszko A, Nowicka G, Struga M, Kantor I, et al. Immunological aspects of Graves' ophthalmopathy. *Biomed Res Int* 2019;7453260.
36. Tsai CC, Wu SB, Cheng CY, Kao SC, Kau HC, Chiou SH, Hsu WM, Wei YH. Increased oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and reactive oxygen species in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy: evidence that oxidative stress has a role in this disorder. *Eye (Lond)* 2010;24:1520–5.

37. Lu R, Wang P, Wartofsky L, Sutton BD, Zweier JL, Bahn RS, Garrity J, Burman KD. Oxygen free radicals in interleukin-1beta-induced glycosaminoglycan production by retro-ocular fibroblasts from normal subjects and Graves' ophthalmopathy patients. *Thyroid* 1999;9:297–303.
38. Tsai CC, Cheng CY, Liu CY, Kao SC, Kau HC, Hsu WM, Wei YH. Oxidative stress in patients with Graves' ophthalmopathy: relationship between oxidative DNA damage and clinical evolution. *Eye (Lond)* 2009;23:1725–30.
39. Larsen CB, Riis KR, Winther KH, Larsen EL, Ellervik C, Hegedüs L, et al. Treatment of hyperthyroidism reduces systemic oxidative stress, as measured by markers of RNA and DNA damage. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:e2512–20.
40. Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, et al. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3375–9.
41. European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis, Evans MD, Olinski R, Loft S, Cooke MS. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J* 2010;24:1249–60.
42. Bartalena L, Wiersinga WM, Pinchera A. Graves' ophthalmopathy: state of the art and perspectives. *J Endocrinol Invest* 2004;27:295–301.
43. Schott M, Scherbaum WA, Morgenthaler NG. Thyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:243–8.
44. Kahaly GJ, Diana T. TSH Receptor antibody functionality and nomenclature. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:28.
45. Lytton SD, Kahaly GJ. Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update. *Autoimmun Rev* 2010;10:116–22.

F. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

1. **Sarić Matutinović M**, Diana T, Nedeljković Beleslin B, Ćirić J, Žarković M, Kahaly GJ, Ignjatović S. Clinical value of functional thyrotropin receptor antibodies in Serbian patients with Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest* 2022;45:189–97. doi: 10.1007/s40618-021-01652-y. (IF 4,256; rang časopisa M22 (63/146) u kategoriji *Endocrinology & Metabolism*)
2. **Sarić Matutinović M**, Diana T, Nedeljković-Beleslin B, Ćirić J, Žarković M, Perović-Blagojević I, Kahaly GJ, Ignjatović S. Sensitivity of three thyrotropin receptor antibody assays in thyroid-associated orbitopathy. *J Med Biochem* 2022;41:211–20; doi: 10.5937/jomb0-34718. (IF 3,402; rang časopisa M23 (181/296) u kategoriji *Biochemistry & Molecular Biology*)

G. Mišljenje i predlog

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Ovo je prvo istraživanje u našoj zemlji koje se bavilo analizom funkcionalnog profila TSHRA_t i pitanjem kliničke vrednosti TSHRA_t u ovoj populaciji pacijenata. Pored aktuelnosti naučnih pitanja, ova studija je sprovedena u referentnoj klinici tercijarnog nivoa zdravstvene zaštite, zbog čega je analizirani uzorak pacijenata bio raznovrstan po pitanju aktivnosti i težine kliničke slike GO. Od posebnog je značaja i podatak da je studija sprovedena samo u jednom nacionalnom centru. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na značaj implementacije novih seroloških biomarkera u dijagnostičke protokole GO. Osim kliničkog značaja, dobijeni rezultati doprinose dosadašnjem razumevanju inflamatornih procesa u okviru orbite, kao i razvoju novih preventivnih i terapijskih protokola kod ovih pacijenata. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M22 i M23.

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „**Klinička vrednost antitela na TSH receptore kod pacijenata sa Graves-ovom oftalmopatijom/orbitopatijom**“, kandidata magistra farmacije – medicinskog biohemičara, Marije Sarić Matutinović.

Dr sc. Miloš Žarković

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Aleksandra Topić

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Neda Milinković

docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Beograd, 13.06.2022. godine