

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 30.06.2023. godine, broj 14/XV-3/3-PM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj dokazivanja anti-Epštajn Bar virusnih antitela u pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom: udruženost sa kliničkim i imunoserološkim ispoljavanjem bolesti“

kandidata dr Rade Mišković zaposlene u Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentori su Prof. dr Sanvila Rašković i Prof. dr Ana Banko.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vesna Tomić Spirić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandra Perić Popadić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Danijela Miljanović, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Doc. dr Anđa Ćirković, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
5. Prof. dr Igor Mitić, 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 doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Rade Mišković napisana je na ukupno 78 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 19 tabela i šest grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, zahvalnicu,

spisak skraćenica korišćenih u tekstu, spisak publikovanih radova proisteklih iz rada na doktorskoj disertaciji i priloge.

U **uvodu** su prikazani podaci o epidemiologiji sistemskog eritemskog lupusa (SEL) i glavni do sada poznati patogenetski mehanizmi bolesti, sa posebnim osvrtom na genetičke i faktore okoline. Detaljno je prikazana klinička prezentacija i način postavljanja dijagnoze SEL, mogućnosti i ograničenja važećih klasifikacionih kriterijuma i potencijalnih biomarkera bolesti. Opisani su načini procene aktivnosti bolesti i stepena oštećenja u vezi sa lupusom, uključujući i ishode koje procenjuje pacijent. Na adekvatan način su prikazani terapijski ciljevi sa osvrtom na definisanje stanja remisije i niske aktivnosti bolesti. Detaljno su opisane morfološke, strukturne i genetičke karakteristike i životni ciklus Epstein-Bar virusa (EBV). Objašnjene su karakteristike imunskog odgovora domaćina na EBV, sa posebnim akcentom na do sada poznate mehanizme kojim EBV izbegava imunski odgovor domaćina. Sistematski su prikazane mogućnosti molekularne i serološke dijagnostike EBV infekcije. Analizirani su detaljno iz literature poznati mehanizmi indukcije autoimunosti u SEL posredovane EBV i značaj reaktivacije EBV sa fokusom na moguću ulogu u patogenezi.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja prisustva, klase i titra antitela na EBV antigene (VCA, EBNA-1, EA(D)), prisustva EBV gena (EBNA1 i LMP1) i određivanja statusa EBV infekcije u ispitanika sa SEL, kao i njihove udruženosti sa kliničkim i imunoserološkim karakteristikama ispitanika i stepenom aktivnosti lupusa. Takođe, kao cilj rada navedeno je ispitivanje promene seroloških markera i statusa EBV infekcije u odnosu na postizanje remisije u grupi pacijenata sa aktivnim SEL šest meseci od započinjanja lečenja, kao i potencijalnih prediktora prelaska iz aktivne u latentnu EBV infekciju. Dodatni cilj rada je bilo i ispitivanje učestalosti polimorfizama gena za *IL10RA*, *IL10RB* i *IL22RA*, i njihove povezanosti sa kliničkim i imunoserološkim manifestacijama SEL.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj kohortnoj studiji koja je sprovedena na Klinici za alergologiju i imunologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, Institutu za mikrobiologiju i imunologiju i Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu između juna 2020.godine i maja 2022.godine. Detaljno su opisani kriterijumi za uključanje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije, i način određivanja aktivnosti SEL. Kontrolna grupa jasno je definisana. Opisan je način uzimanja i skladištenja uzorka, izolovanja virusne DNK i dokazivanja EBNA1 i LMP1 gena, određivanja seroloških markera EBV i statusa infekcije, način izolacije humane DNK, analize

polimorfizama gena za *IL10RA*, *IL10RB* i *IL22RA* i analize imunoseroloških markera SEL. Aktivnost SEL i procena zamora analizirane su primenom kako tradicionalnih metoda tako i novorazvijenih ishodnih mera kao što je LFA REAL ClinRO i LFA REAL PRO. Detaljno su opisane primenjene metode statističke analize podataka. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odluke 1322/V-5). Svi pacijenti su dali pisani informisani pristanak pre uključanja u studiju.

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 220 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije “Značaj dokazivanja anti-Epštajn Bar virusnih antitela u pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom: udruženost sa kliničkim i imunoserološkim ispoljavanjem bolesti“, autora dr Rade Mišković, utvrđeno je ukupno podudaranje teksta koje iznosi 10% (Similarity index). Ovaj stepen podudarnosti posledica je citata, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, tzv. opštih mesta i podataka, dok 2% podudarnosti proističe iz prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Određivanje prisustva EBV DNK u plazmi ispitanika sa SEL pokazalo je prevalencu od 10,7%, što se nije statistički značajno razlikovalo u odnosu na kontrolnu grupu. Serološke analize su

pokazale da ispitanici sa SEL imaju značajno višu prevalencu anti-VCA IgM, anti-EA(D) IgG i anti-EA(D) IgM antitela u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, nije nađena razlika u učestalosti anti-EBV antitela u odnosu na aktivnost SEL. Aktivna EBV infekcija je značajno češće nađena kod ispitanika sa SEL u odnosu na kontrolnu grupu. Učestalost aktivne EBV infekcije nije se značajno razlikovala između grupe ispitanika sa aktivnim SLE i onih u remisiji/LLDAS. U odnosu na registrovani titar anti-EBV antitela, zabeležene su značajno više vrednosti titra anti-VCA IgM, anti-EA(D) IgG, i anti-EA(D) IgM antitela u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, titar nijednog od ispitivnih anti-EBV antitela nije se značajno razlikovao između grupe ispitanika sa aktivnim SEL i onih u grupi remisija/LLDAS. Analiza polimorfizama u okviru gena za *IL10RA*, *IL10RB* i *IL22RA* receptore pokazala je distribuciju ispitivanih polimorfizama koja je u skladu sa Hardy-Weinberg-ovim ekvilibrijumom. Ovom analizom je nađeno da su ispitanici u kontrolnoj grupi značajno češće bili nosioci G alela *IL10RB* rs1058867 u odnosu na ispitanike sa SEL (76,8% vs 61,2%). Prilikom analize haplotipova u svih ispitanika (SEL i kontrolna grupa, N=202) uočen je blok haplotipa *IL10RA*. Kod ispitanika sa SEL uočen je blok haplotipa između rs10892202 i rs4252270 i između polimorfizama rs22296110 i rs9610, dok je u kontrolnoj grupi nađen blok haplotipa između polimorfizama rs10892202 i rs4252270. Analizom haplotipova za *IL10RB* uočen je blok haplotipa između rs999788 i rs2834167 polimorfizama u SLE ispitanika, a *IL10RB* CAA haplotip je značajno češće bio prisutan u SLE ispitanika nego u kontrolnoj grupi (42,7% vs 30,7%). U okviru *IL22RA* polimorfizama (rs16829204, rs3795299) nije uočen blok haplotipa. Primenom univarijantne regresione analize prisustvo anti-VCA IgM, anti-EA(D) IgG, i anti-EA(D) IgM antitela, kao i viši titar anti-VCA IgM i anti-EA(D) IgG antitela, aktivna EBV infekcija i prisustvo G alela *IL10RB* rs1058867 su bili potencijalno udruženi sa SEL. Međutim u multivarijantnom regresionom modelu samo prisustvo anti-EA(D) IgG antitela je bio nezavisan faktor udružen sa SEL, pokazavši da ovi ispitanici imaju čak 14 puta veću verovatnoću da imaju SEL. Ispitivanje uticaja EBV infekcije na klinički manifestacije i aktivnost SLE pokazala je da su ispitanici sa aktivnom EBV infekcijom značajno češće koristili neki od imunosupresivnih lekova (37% vs 19%), međutim status EBV infekcije nije bio udružen sa aktivnošću lupusa bez obzira na primenjeni instrument merenja (SLEDAI2K, serološki SLEDAI2K, klinički SLEDAI2K, PGA, LFA-REAL Clin RO). EBNA1 gen je češće detektovan kod ispitanika sa lupus nefritisom (36% vs 12%) i limfopenijom (80% vs 47%). Poređenjem ostalih manifestacija SEL nije uočena značajna razlika u odnosu na prisustvo EBNA1 gena. Primenom modela multivarijante regresione analize nađeno je da je viši titar anti-VCA IgG antitela prediktor alopecije kod ispitanika sa SEL (OR=1,018), dok je viši titar anti-

EBV-EA(D) IgG antitela bio prediktor limfopenije (OR=1,040). Detektovana je blaga korelacija titar anti-EA(D) IgG sa vrednostima CRP, brojem leukocita i limfociti, kao i blaga korelacija SLEDAI2K i serološkog SLEDAI2K sa titrom anti-EA(D) IgG antitela. U odnosu na imunoserološke parametre lupusa detektovana je pozitivna umerena korelacija između titra anti-VCA IgM antitela i RF, dok su ostale statistički značajne korelacije bile blagog stepena. Analiza uticaja polimorfizama gena *IL10RA*, *IL10RB* i *IL22RA* na kliničko i imunoserološko ispoljavanje bolesti i prisustvo pridruženih autoimunih bolesti pokazala je značajnu udruženost pre svega sa hematološkim manifestacijama SEL. Prema rezultatima univarijantne logističke regresione analize ispitanici sa SEL koji su nosioci *IL22RA* rs3795299 G alela imaju 4,5 puta veću šansu da razviju neku od hematoloških manifestacija SEL, i 3,8 puta veću šansu za pojavu limfopenije. Nosioci *IL10RA* rs10892202 C alela i *IL10RA* rs4252270 T alela imali su skoro 11,6 puta veću šansu za pojavu autoimune hemolizne anemije. Takođe, analizom je nađena i udruženost sa kožnim manifestacijama SEL, pa su nosioci *IL10RA* rs10892202 GG genotipa i *IL10RA* rs4252270 CC genotipa imali su 4,4 puta veću šansu pojave malarnog raša. Sjogrenov sindrom je bio 2,7 odnosno 3,9 puta verovatniji kod ispitanika koji su nosioci *IL10RA* rs3135932 AA genotipa i *IL22A* rs3795299 CC genotipa, dok su ispitanici sa SEL koji su nosioci *IL10RA* rs9610 GG genotipa, *IL22RA* rs3795299 C alela i *IL22RA* rs16829204 CC genotipa imali su redom 3,2, 4,3 i 5 puta veću šansu pridruženog Hashimoto thyroiditisa. Zbirnom analizom obe grupe ispitanika (SEL i kontrolna grupa, n=202) potvrđeno je da nosioci rs16829204 CC genotipa imaju značajno češće Hashimoto thyroiditis u odnosu na nosioce T alela (20,4% vs 5,1%, OR=4,79), a nosioci rs3795299 C alela značajno češće u odnosu na nosioce GG genotipa (23,5% vs 4,9%, OR=6,0). Ova povezanost ostala je značajna i nakon primene multivarijantne regresione analize. Prikazani su i rezultati analize haplotipova koja je pokazala da je *IL10RA* GCGAAG haplotip značajno češći kod SLE ispitanika bez pridruženog SS, a *IL10RA* GCAAGA i *IL22RA* GT haplotipovi kod onih bez pridruženog Hashimoto thyroiditisa. S druge strane, SEL ispitanici sa pridruženim HT bili se češće nosioci *IL22RA* CC haplotipa. U odnosu na kliničke manifestacije detektovana je udruženost sa mukokutanim manifestacijama pa su *IL10RA* CTAAGG, *IL10RB* TGG i *IL22RA* GC haplotipovi bili ređi kod ispitanika sa malarnim rašom, *IL10RA* GCAAGA haplotip je bio češći u ispitanika sa alopecijom, a oralne ulceracije kod ispitanika sa *IL10RB* CAA haplotipom. *IL10RB* CGA haplotip nosio je rizik od trombocitopenije (12,5% vs 4,3%) i lupus nefritisa (13,0% vs 4,2%), a bio je protektivan u odnosu na postojanje artritisa (20% vs 4,8%). U prospektivnom delu studije praćen je 51 ispitanik sa aktivnim SEL tokom perioda od šest meseci. Dva pacijenta su preminula pa je konačna analiza obuhvatila 49 ispitanika. Najčešće kliničke manifestacije

zabeležene u ovoj podgrupi bile su mukokutane (78%), mišićno-skeletne (74%) i hematološke (69%), koje su se nakon šest meseci značajno redukovale ili u potpunosti povukle. Zabeleženo je značajno smanjenje vrednosti svih primenjivanih skorova i indeksa aktivnosti SEL (SLEDAI 2K, PGA, LFA Clin RO) nakon šest meseci, ali i značajan porast indeksa oštećenja SLICC/ACR DI. Nakon šest meseci 77% ispitanika je prešlo iz aktivne u latentnu EBV infekciju. Od inicijalno 24 ispitanika koji su imali aktivnu EBV infekciju samo pet je i dalje imalo aktivnu infekciju, a kod tri pacijenta sa inicijalno znacima latentne EBV infekcije nakon šest meseci nastala je aktivna EBV infekcija. Na prelazak iz aktivne u latentnu EBV infekciju nije uticala primenjena terapija, niti prisustvo pridruženih autoimunskih bolesti. U odnosu na prisustvo virusne DNK, samo jedan pacijent je i nakon šest meseci bio pozitivan na EBNA1 gen, dok su svi uzorci koji su inicijalno bili pozitivni za LMP1 gen, bili negativni nakon šest meseci. Seroprevalenca anti-EBNA1 IgG i anti-VCA IgM antitela se značajno smanjila nakon šest meseci. Detektovane su i promene u titru anti-EBV antitela, i to značajna redukcija titra anti-EBNA1 IgG i anti-VCA IgM i značajan porast titra anti-EA(D) IgG antitela. Titar anti-EA(D) IgM i anti-VCA IgG antitela nije se značajno promenio. Nijedna od virusnih varijabli nije bila udružena sa postizanjem remisije/LLDAS. Analizom podgrupa ispitanika sa SEL u zavisnosti od kliničke prezentacije bolesti i primenom modela logističke regresione analize identifikovani su prediktori remisije/LLDAS. Titar anti-EA(D) IgM antitela je bio nezavisan prediktor remisije/LLDAS (OR=2,694) u podgrupi ispitanika sa mukokutanim manifestacijama (alopecija, mukozalne ulceracije, kožne manifestacije), a leukopenija (OR=26,313) i prisustvo anti-EA(D) IgM antitela (OR=40,097) bili su nezavisni prediktori ulaska u remisiju/LLDAS u podgrupi pacijenata sa kožnim manifestacijama. U multivarijantnoj regresionoj analizi, niži titar ANA i viša koncentracija C3 su bili nezavisni prediktori prelaska iz aktivne u latentnu EBV infekciju (RR=0,996;RR=36,441, redom). Primenom ROC krive, koncentracija C3 u serumu identifikovana je kao marker prelaska iz aktivne u latentnu EBV infekciju, pri čemu je cut-off vrednost za C3 koncentraciju iznosila 0,780 g/l (Sn=70,6%, Sp=75,0%).

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Virusi, a pogotovo EBV su odavno prepoznati kao pokretači autoimunosti kod genetski predisponiranih osoba. Ipak, zbog složenosti odnosa između EBV i domaćina, kao i raznolikosti rezultata dosadašnjih istraživanja, veza između reaktivacije EBV i SEL još uvek nije u potpunosti razjašnjenja. U ovoj prospektivnoj kohortnoj studiji po prvi put u našoj populaciji je

sprovedena detaljna evaluacija seroloških i molekularnih parametara EBV infekcije u ispitanika sa SEL, kao i uticaja genetičke osnove u nastanku i fenotipskoj ekspresiji SEL. Detaljna karakterizacija ispitanika sa SEL pokazala je da su kožno-zglobne i hematološke manifestacije lupusa najčešće u ispitanika sa SEL u našoj populaciji, što je u skladu sa rezultatima iz literature (Rahman i sar., 2008, Fara i sar., 2019, Riancho-Zarrabeitia i sar., 2020). Obzirom da određivanje aktivnosti lupusa često predstavlja izazov u svakodnevnoj praksi, a u cilju boljeg definisanja aktivnosti lupusa u ispitivanoj grupi primenjeno je i upoređeno nekoliko indeksa i skala za merenje aktivnosti SEL. Po prvi put u našoj populaciji primenjen je novorazvijeni LFA-REAL sistem koji obuhvata ne samo procenu aktivnosti od strane lekara, već i viđenje aktivnosti lupusa od strane samih pacijenata. Pokazana je značajna jaka pozitivna korelacija LFA-REAL Clin RO sa ostalim indeksima: SLEDAI-2K, kliničkim SLEDAI-2K i PGA. Umerena do jaka pozitivna korelacija ovih instrumenata nađena je i u Peruanskoj Almenara kohorti pacijenata sa SEL, pri čemu je, slično kao u ovom ispitivanju najbolja korelacija nađena sa PGA (Ugarte-Gil MF i sar., 2020). Primenjen je i LFA-REAL PRO koji je koncipiran na sličan način kao i skala koju ocenjuje lekar. Pokazana je slaba do umerena korelacija sa LFA-REAL Clin Ro, SLEDAI-2K, kliničkim SLEDAI-2K i PGA. S druge strane u Peruanskoj Almenara kohorti nađena je slaba korelacija LFA-REAL PRO sa indeksima koje ocenjuje lekar (Ugarte-Gil MF i sar., 2020). U odnosu na status EBV infekcije, pokazana je viša učestalost aktivne EBV infekcije (41,7%) u ispitanika sa SEL u odnosu na kontrolnu grupu (9,2%). Prevalenca aktivne EBV infekcije bila je viša u ispitanika sa aktivnim lupusom (47,1%) u odnosu na one u remisiji/LLDAS (36,5%), ali ta razlika nije bila statistički značajna. Registrovan je i značajno viši titar i seroprevalenca anti-VCA IgM (25,2% vs 3%), anti-EA(D) IgG (34% vs 5,1%) i anti-EA(D) IgM (21,4% vs 8,1%) antitela u odnosu na kontrolnu grupu, ali nije bilo razlike u odnosu na prevalencu virusne DNK u plazmi. I mnogi drugi autori su pokazali sličnu prevalencu reaktivacije EBV i izmenjen humoralni imunski odgovor u pacijenata sa SEL u odnosu na kontrolnu grupu (Li ZX i sar., 2019, Chougale D i sar., 2018, Wood RA i sar., 2021, Rasmussen N i sar., 2015, Han L i sar., 2018, Vista S i sar., 2017, Hanlon P i sar., 2014). Pojedini autori su međutim našli učestalost reaktivacije EBV u SEL i do 78,2% (u odnosu na takođe visoku prevalencu od 62% u kontrolnoj grupi) (Chougale D i sar., 2018). Sveobuhvatan panel anti-EBV antitela korišćen je međutim u svega nekoliko studija (Huggins i sar., 2005, Das P i sar., 2022, Sternbaek i sar., 2019). Studije koje su se bazirale na određivanju virusne DNK pokazale su još veće varijacije u prevalenci reaktivacije EBV (Li ZX i sar., 2019). Zbog ovakvih podataka sugerisan je oprez u interpretaciji dobijenih rezultata i donošenju zaključaka. Malo se autora bavilo ispitivanjem uticaja pogoršanja lupusa na kontrolu EBV

infekcije. Značajno viša učestalost virusom inficiranih B limfocita nađena je u studiji Gross i saradnika u ispitanika sa SEL koji su imali pogoršanje tokom prethodna tri meseca (Gross AJ i sar., 2005). U ovom ispitivanju nije međutim nađena udruženost aktivnosti lupusa i reaktivacije EBV infekcije, kao ni postizanja remisije/LLDAS i prelaska virusa u latentnu fazu, što se objašnjava heterogenošću kohorte i načinom utvrđivanja aktivne EBV infekcije (serum/plazma vs limfociti). Istraživanje je takođe pokazalo da je prisustvo anti-EA(D) IgG antitela u serumu nezavisan prediktor SEL, i da povećava 14 puta šansu da osoba ima SEL. Ovaj važan nalaz je u saglasnosti sa do sada jedinom prospektivnom studijom koja je tokom 6 godina pratila serološke markere EBV infekcije u srodnika pacijenata sa SEL, pokazavši da su povišeni anti-VCA IgG i anti-EA IgG udruženi sa razvojem SEL (Jog NR i sar., 2021). Navedena studija je takođe po prvi put ukazala na vezu između anti-EBV antitela i polimorfizama u okviru gena za IL-10, našavši značajnu interakciju između nivoa anti-VCA IgA i IL10 rs302449 sa razvojem SEL (Jog NR i sar. 2021). Doktorand je u svom ispitivanju analizirala šest polimorfizama za *IL10RA*, tri za *IL10RB* i dva za *IL22RA* i pokazala da polimorfizami gena za *IL10RA*, niti *IL10RA* haplotipova nisu udruženi sa razvojem SEL, a pokazan je protektivni efekat *IL10RB* rs1058867 G alela. Herman i saradnici su pokazali udruženost *IL10RA* rs2229113 sa pojavom reumatoidnog artritisa i SEL (Herman J i sar., 2009). Peng i saradnici su našli udruženost *IL10RB* rs2834167 alela A sa pojavom SEL (Peng H i sar., 2013). U odnosu na kliničke manifestacije lupusa ispitanici sa *IL10RA* rs10892202 i rs4252270 polimorfizmom, i GC haplotipom, češće su imali malarni raš, dok su nosioci *IL10RA* rs2229113 GG genotipa češće imali fotosenzitivnost. Nosioci *IL10RA* rs9610 alela G češće su imali artritis kao manifestaciju lupusa. Hemolizna anemija je 11,59 puta bila češća kod nosioca *IL10RA* rs10892202 alela C i rs4252270 alela T. Uvidom u literaturne podatke, nijedna studija do sada nije analizirala udruženost *IL10RB* polimorfizama i kliničkog ispoljavanja lupusa. Nosioci *IL10RB* rs2834167 AA genotipa i rs999788 CC genotipa, češće su imali malarni raš. Prethodno je nađena udruženost ova dva genotipa sa sistemskom sklerozom (Hikami K i sar., 2018). Pregledom literature nisu identifikovane studije su analizirale polimorfizam *IL22RA* gena u autoimunskim bolestima. Nađeno je da nosioci *IL22RA* rs3795299 G alela imaju 4,5 puta veći rizik da razviju neku od hematoloških manifestacija, i 3,8 puta veći rizik za pojavu limfopenije. Uočena je i udruženost *IL22RA* rs16829204 alela T i prisustva anti-Sm antitela. Celokupna genetska analiza ukazala je na ulogu ispitivanih polimorfizama na pojavu, kliničko i imunoserološko ispoljavanje SEL. U prospektivnom delu ispitivanja praćeni su pacijenti sa aktivnim lupusom, pri čemu je pokazan značajan pad prevalencije aktivne EBV infekcije nakon šest meseci, kada je 77% ispitanika prešlo u latentnu EBV infekciju. Registrovane su i značajne promene prevalencije

i titra anti-EBNA-1 IgG i anti-VCA IgM koji su se smanjili, dok je titar anti-EA(D) IgG antitela porastao. U nekoliko studija nađena je veza između reaktivacije EBV infekcije i stepena aktivnosti SEL (Wood Ra i sar., 2021, Han L i sar., 2018, Brito-Zeron P i sar., 2017). U ispitivanoj kohorti sa aktivnim lupusom, premda je većina ispitanika prešla iz aktivne u latentnu EBV infekciju, nije bilo razlike u pogledu postizanja remisije/LLDAS nakon šest meseci. Pregledom literature nisu identifikovne druge studije koje su prospektivno bavile analizom statusa EBV infekcije u pacijenata sa SEL. Nekoliko ranijih istraživanja ukazala su na moguću ulogu EBV u određenim fenotipovima SEL, pre svega u kožno-zglobnoj formi bolesti (Franca SA Le S i sar., 2022, Chougle D i sar., 2018). U ovom ispitivanju je pokazano da je viši titar anti-EA(D) IgM antitela pozitivan prediktor remisije/LLDAS u SLE ispitanika sa aktivnim kožnim manifestacijama bolesti, i to sa $RR=40,097$. Nekoliko autora je pokazalo udruženost anti-EA(D) IgG antitela sa prisustvom anti-ENA antitela i Raynaud-ovim fenomenom, i sa kožno-zglobnim manifestacijama lupusa i anti-Ro antitelima (Zandman-Goddard G i sar., 2009, Esen BA i sar., 2012). Eksperimentalna istraživanja na životinjama potvrđuju ovu pretpostavku (Tu S i sar., 2018). Primenom multiple logističke regresione analize viša koncentracija C3 u serumu bila je nezavisni prediktor prelaska u latentnu EBV infekciju nakon šest meseci. Analizom ROC krive, serumska koncentracija $C3 \geq 0,780$ g/L sa senzitivnošću od 70,6% i specifičnošću od 75%, je razlikovala ispitanike koji su prešli u latentnu fazu od onih koji su i dalje bili aktivni. Nekoliko studija ukazalo je na ulogu sistema komplementa u EBV infekciji (Mold C i sar., 1988, Jindal M i sar., 1976). Ispitivanje u pacijenata sa Sjogrenovim sindromom, uključujući i meta-analizu podataka iz literature pokazalo je inverznu udruženost između koncentracije C3 i C4 i titra anti-EA (D) IgG antitela (Xuan J i sar., 2020).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Miskovic R, Cirkovic A, Miljanovic D, Jeremic I, Grk M, Basaric M, Lazarevic I, Stojanovic M, Plavsic A, Raskovic S, Banko A. **Epstein–Barr Virus Reactivation as a New Predictor of Achieving Remission or Lupus Low Disease Activity State in Patients with Systemic Lupus Erythematosus with Cutaneous Involvement.** *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6156. doi.org/10.3390/ijms24076156 M21 IF 6.208

Miskovic R, Banko A, Raskovic S. **The role of Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus.** *Medicinski podmladak.* **2023**, *74(3)* doi.10.5937/mp74-41512 M52

Miskovic R, Miljanovic D, Dimic Cumic M, Lazarevic I, Banko A. Epstein–Barr virus positive gastric adenocarcinoma with systemic EBV reactivation in a patient with persistently active systemic lupus erythematosus. *Oncologie*, vol. 25, no. 1, 2023, pp. 93-97. doi.org/10.1515/oncologie-2022-1010 M23 IF 0.900

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj dokazivanja anti-Epštajn Bar virusnih antitela u pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom: udruženost sa kliničkim i imunoserološkim ispoljavanjem bolesti“ dr Rade Mišković, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja EBV u nastanku i kliničkom ispoljavanju SEL. Sveobuhvatnom analizom ne samo kompletnih seroloških već i molekularnih markera EBV infekcije, status EBV infekcije je precizno određen, ukazavši na visoku prevalencu aktivne EBV infekcije u ispitanika sa SEL u odnosu na kontrolnu grupu u našoj populaciji. Posebno važan rezultat je identifikacija anti-EA(D) IgG antitela kao potencijalnog prediktora razvoja SEL koja u svakodnevnom radu može biti značajna pomoć u stratifikaciji ANA pozitivnih pacijenata koji su u povećanom riziku od razvoja SEL. Takođe, prospektivnim praćenjem pacijenata sa aktivnim SEL virusni marker (anti-EA(D) IgM) identifikovan kao mogući prediktor ulaska u remisiju u pacijenata sa SEL i dominantno kutanim manifestacijama. Ukoliko se ovaj nalaz potvrdi i u drugim populacijama, jedan virusni marker bi po prvi put mogao biti korišćen u prognozi jedne autoimune bolesti. U sklopu procene aktivnosti SEL primenjen je novorazvijeni LFA-REAL sistem za koji je pokazano da dobro koreliše sa najčešće primenjivanim instrumentima za procenu aktivnosti lupusa čime je dobijen novi koristan instrument potreban u boljem sagledavanju aktivnosti SEL u našoj populaciji. Dodatnom molekularno-genetskom analizom polimorfizama gena za *IL10RA*, *IL10RB* i *IL22RA* preko kojih svoje efekte ostvaruje i virusni (EBV) homolog IL-10 identifikovani su genotipovi udruženi sa kliničkim manifestacijama SEL i postojanjem pridruženih autoimunih bolesti. Time je indirektno dobijena dodatna potvrda važne uloge EBV u patogenezi SEL. Ova genetska analiza takođe predstavlja prvu takve vrste u našoj populaciji. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

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

U Beogradu, 04.07.2023

Članovi Komisije:

Prof. dr Vesna Tomić Spirić

Prof. dr Aleksandra Perić Popadić

Doc. dr Danijela Miljanović

Doc. dr Anđa Ćirković

Prof. dr Igor Mitić

Mentori:

Prof. dr Sanvila Rašković

Prof. dr Ana Banko
