

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/43, од 13.07.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Ружице Лукић, под називом:

„Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом“

Чланови комисије су:

1. **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **проф. др Маја Ђупић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, члан
3. **проф. др Жељко Мијаиловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан
4. **проф. др Дејан Петровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан
5. **доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Ружица Лукић је рођена 25.02.1976. године у Фочи. Основну школу и средњу Просветно-културолошко преводилачку школу завршила је у Фочи. Медицински факултет у Фочи уписала је 1994/95. године, а дипломирала 2001. године, са просечном оценом 7,75 (седам и 75/100) и тиме стекла звање доктора медицине. Након завршеног факултета запошљава се у Универзитетској болници у Фочи. Специјалистичке студије из области Микробиологија са паразитологијом уписала је школске 2004/05. године на Медицинском факултету у Београду, а специјалистички испит положила у јулу 2008. године, под

менторством проф. др Милене Швабић. Од тада ради као специјалиста и шеф одсека за бактериологију у Универзитетској болници у Фочи. Од школске 2012/13. године ради и као клинички сарадник на Медицинском факултету у Фочи на Катедри за микробиологију и имунологију. Ужу специјализацију из Вирусологије уписала је на Медицинском факултету у Београду школске 2013/14. године, а испит положила у септембру 2015. Специјалистичке академске студије из Клиничке и експерименталне микробиологије уписала упоредо са ужом специјализацијом, школске 2013/14. године на Медицинском факултету у Београду и завршила са просечном оценом 9,36 и одбраном рада под насловом: МЕХАНИЗМИ УНУТАРЊЕЛИЈСКОГ ПРЕЖИВЉАВАЊА ХЛАМИДИЈА, 06.10.2014. године.

Докторске академске студије, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација, уписала је 2014. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Усмени докторски испит је положила у јуну 2016. године са оценом 9 (девет).

Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2.Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом“

Предмет: Карактеристике хепатитиса С и антивирусног имунског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом (ТБИ)на хемодијализи.

Хипотеза: Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и вирусним хепатитисом С имају мање вредности параметара који одсловавају функције јетре (трансаминазе, гама GT, LDH), већу виремију (*viral load*), мање серумске вредности про-инфламацијских цитокина, а веће вредности анти-инфламацијских цитокина у односу на пацијенте са вирусним хепатитис С.

2.3.Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је испунио статутарне услове неопходне да би пријавио докторску дисертацију јер је као први аутор објавио рад у целини у часопису категорије М52, који излази на једном од водећих светских језика,:

Lukic R, Lukovic B, Gajovic N, Prljic S, Djukic S.Mechanism of intracellular chlamydiae survival. *Serb J Exp Clin Res* 2016; 17(2): 145-151 (M52)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Хепатитис С вирус (HCV) узрочник хепатитиса С, је водећи узрочник хроничног обољења јетре у светској популацији. Сматра се да око 3% светске популације (170-200 милиона људи) има хроничну HCV инфекцију, односно да око 2,7 милиона има активни хепатитис С, који је дефинисан присуством специфичних анти HCV антитела у серуму односно HCV RNK у крви пацијената. Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, који су на хемодијализи, представљају ризичну групу за HCV инфекцију, због инвазивних медицинских процедура којима су изложени. Иако је данас ризик од нозокомијалне HCV трансмисије сведен на минимум због употребе одвојених дијализних машина за HCV позитивне и негативне пацијенте и даље постоји могућност стицања ове инфекције на одељењима за хемодијализу. Према литературним подацима, преваленција HCV инфекције код хемодијализираних пацијената је виша него у општој популацији и износи 3% у земљама западне Европе, до чак 20% у земљама јужне Европе. HCV инфекцију карактерише интеракција између имунског система домаћина и самог вируса. Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције. Дефекти имунског система су вероватно последица дејства такозваних „уремичних токсина“, који обухватају велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. Reactive Oxygen Species- ROS).

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Од резултата студије се очекује да дефинишу утицај терминалне бубрежне инсуфицијенције на карактеристике хепатитиса С, тежину оштећења јетре и антивирусни имунски одговор.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај терминалне бубрежне инсуфицијенције на тежину оштећења јетре код хепатитиса С као и на модулацију антивирусног имунског одговора.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

Утврдити учинак терминалне бубрежне инсуфицијенције на:

1. клиничко-биохемијске параметре функције јетре (трансаминазе, гама GT, LDH);
2. виремију („viral load“);

3. концентрације цитокина (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN- γ и TNF- α) у серуму; код пацијената са хепатитис С вирусном инфекцијом.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Хепатитис С вирусна инфекција представља озбиљан глобални здравствени проблем. Сваке године се зарази 3-4 милиона људи, а више од 350.000 умре годишње од обољења повезаних са хепатитис С вирусном инфекцијом.

Надзор над HCV инфекцијом подразумева две стратегије: серолошку, којом се у свакодневном раду најчешће доказује HCV инфекција детекцијом специфичних HCV антитела, док су за потврду инфекције и утврђивање активности вируса, од посебног значаја молекуларни тестови. Савремена HCV дијагностика базира се на примени молекуларно биолошких метода као што су квалитативни PCR тестови за доказивање HCV RНК, real time“ PCR за квантификовање HCV генома тј. утврђивање виремије- „viral load“ као и методе за генотипизацију HCV.

Сматра се да је оштећење јетре последица пре свега анти-HCV имунског одговора, а не директног цитопатогеног ефекта вируса per se. HCV инфекцију карактерише интеракција између имунског система домаћина и самог вируса. Са појавом вирусних антигена, у крвотоку, покрећу се и ефекторски механизми урођене и стечене имуности. NK ћелије представљају прву линију одбране од вирусних инфекција. Оне реагују на интрацелуларне микроорганизме убијањем инфицираних ћелија - хепатоцита и продукцијом IFN- γ који активира макрофаге. Стечена имуност игра значајну улогу у елиминацији вируса и контроли инфекције. Интензитет, разноврсност и квалитет стеченог имунског одговора детерминишу исход инфекције. Ефекторске функције вирус специфичних CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцита критичне су за елиминацију вируса и резолуцију болести. CD8⁺ цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T lymphocyte, CTL) представљају главни механизам стечене антивирусне имуности. CTLs елиминишу вирусом инфициране ћелије продукцијом перфорина и гранзима и посредством лиганада смрти. CTL, који учествују у елиминацији вируса, продукују велике количине IFN- γ . Одговор вирус-специфичних CD4⁺ Т лимфоцита праћен је појачаном секрецијом IL-2 и IFN- γ . С друге стране, перзистентност HCV инфекције праћена је повећаном заступљеношћу регулаторних Т лимфоцита (Treg), који могу директно или индиректно да супримирају активност HCV-специфичних цитотоксичких Т лимфоцита код пацијената. Цитокини представљају протеине које продукују пре свега ћелије имунског система и који су снажни имуномодулатори и главни учесници у заштити од вирусне инфекције, било „обликовањем“ имунског одговора домаћина било инхибирањем репликације вируса. Углавном се класификују у две групе: Тип-1 (про-инфламацијски) цитокини: IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ Ови цитокини учествују у стимулацији вирус-специфичних цитотоксичких Т лимфоцита и следственој елиминацији вируса. Тип-2 цитокини: IL-4, IL-10 стимулишу активацију и диференцијацију В лимфоцита.

Пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, који су на хемодијализи, представљају ризичну групу за HCV инфекцију, због инвазивних медицинских процедура којима су изложени. Имуносупресија је једна од многих последица хроничне бубрежне инсуфицијенције. Измењена стечена имуност (ослабљен имунски одговор на патогене и на вакцинацију) карактеристична је за пацијенте са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом. Пацијенти на хемодијализи често „пате“ од поновљених бактеријских инфекција, имају слаб одговор на хепатитис В вакцину и чешће развијају туморе у односу на општу популацију. Током последњих 20 година, многе студије су се фокусирале на дисфункцију имунског система код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом. Показано је да су и целуларна и хуморална имуност измењене код ових пацијената. Функција Fc- γ рецептора на моноцит/макрофагима је смањена код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, и ова измена функција макрофага доприноси генералној имуносупресији. Т лимфоците карактерише смањена способност пролиферације индуковане митогеном. Описан је дефект у функцији антиген презентујућих ћелија, у експресији костимулатора В7-2 (CD86), што води смањеној пролиферацији и активацији Т лимфоцита (32). Смањена експресија активационог рецептора NKG2D на НК ћелијама и повећана синтеза његовог лиганда MICA детектовани су код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и објашњавају смањену активност НК ћелија као део системске имунодефицијенције регистроване код ових пацијената. Ове абнормалности не могу се кориговати хемодијализом. Неки од ових дефеката су вероватно последица дејства такозваних „уремичних токсина“, који обухватају велики број молекула као што су β 2-микроглобулин и реактивни кисеонични радикали (енгл. Reactive Oxygen Species- ROS).

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Планирана је компаративна-експериментална студија током које ће се упоређивати тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника.

Испитаници

Прву групу испитаника чиниће 40 пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом на хемодијализи и хепатитис С вирусном инфекцијом. Другу групу испитаника представљаће 40 пацијената са хепатитис С вирусном инфекцијом. Трећу групу чиниће 30 пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом на хемодијализи. Четврта група је контролна у њу чине добровољни даваоци крви Универзитетске болнице у Фочи (n=30).

Узорковање

У студију ће бити укључени испитаници са хепатитис С вирусном инфекцијом и/или терминалном бубрежном инсуфицијенцијом на хемодијализи који:

- 1) имају дијагностиковану хепатитис С вирусну инфекцију серолошким тестовима и квалитативним RT-PCR-ом;
- 2) имају дијагностиковану терминалну бубрежну инсуфицијенцију верификовану биохемијским параметрима;
- 3) имају потписан добровољни пристанак за учешће у студији.

Из студије ће бити искључени:

- 1) испитаници са хепатитис С вирусном инфекцијом који су претходно користили терапију (кортикостероиде, имуносупресивне лијекове и биолошку терапију);

Студијске процедуре

Протокол студије подразумева да ће у студију бити укључени сви болесници код којих је HCV инфекција доказана серолошки, налазом анти HCV антитела. Све микробиолошке и биохемијске анализе обавиће се у Универзитетској болници у Фочи (Република Српска).

Серолошка и биохемијска дијагностика

Крв за серолошка испитивања узимаће се корошћењем вакутајнера без додатка антикоагуланаса, након чега би центрифугирањем био издвојен серум. Сви узорци серума чуваће се на -20°C .

За серолошко тестирање користиће се комерцијални китови за детекцију анти HCV антитела, према упутству произвођача, ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) техником, тј. комбинацијом ELISA са финалним флуоресцентним читавањем.

Биохемијски параметри којима би се пратила функција јетре (трансаминазе, гама GT, LDH) анализираће се стандардним методама које препоручује IFCC (енгл. International Federation for Clinical Chemistry and laboratory Medicine).

Квантификација леукоцита и анализа „леукоцитарне формуле“ обавиће се из узорака пуне крви на хематолошком бројачу.

Вирусолошка дијагностика

Активност HCV инфекције пратиће се детекцијом и квантификацијом HCV RНК, коришћењем RT PCR и RTQ PCR. Анализа ће се обављати из пуне крви узете вакутајнер

системом са додатком EDTA. Крв ће се по узимању центрифугирати 10 минута на 2500 обртаја. Слој леукоцита, „buffy coat“ који се издваја између еритроцита и плазме, на даље ће се користити као узорак за изолацију нуклеинске киселине за даље процедуре: RT-PCR, RTQ PCR, односно генотипизацију. Биће издвојено 200 μ l и замрзнуто на -80 C до почетка рада.

За екстракцију нуклеинске киселине користиће се комерцијални кит за RNK изолацију према упутству произвођача (Purelink RNA Mini Kit, Ambion by Life Technology USA).

HCV геном детектоваће се комерцијалним PCR тестом са реверзном транскрипцијом- RT-PCR чији позитивни налаз (детектована HCV RNK) би указивао на активност HCV (Amplacor Hepatitis C virus test, version 2.0, Roche diagnostics Systems, Mannheim, Germany). Ниво виремије ће бити одређиван коришћењем комерцијалног кита за квантитацију HCV RNK (Cobas Amplacor HCV monitor test, version 2.0- Roche diagnostics Systems, Mannheim, Germany) према упутству произвођача.

Мерење цитокина у серуму

Концентрације IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN- γ и TNF- α у серуму испитиваће се одговарајућим комерцијалним ELISA тестом специфичним за хумане цитокине према утврђеном протоколу произвођача.

Варијабиле које се мере у студији

Независне варијабле: Примарна независна узрочна варијабла је терминална бубрежна инсуфицијенција која се детерминише лабораторијским анализама (уреа, креатинин), временом ступања на дијализу и дужином дијализирања.

Зависне варијабле: *Примарне зависне исходне варијабле:* виремија тј. број копија HCV RNK/ml, генотип HCV, серумске концентрације анти HCV антитела.

Секундарне зависне исходне варијабле: лабораторијске анализе (број леукоцита, гама GT, INR, LDH, AST, ALT, вредност билирубина), серумске концентрације IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-33, IFN- γ и TNF- α .

Збуњујуће варијабле: Старост болесника, терапија болесника

Снага студије и величина узорка

Снага студије за истраживање је рачуната на основу студије Vabaei M и сарадника где је као примарна, зависна исходна варијабла узета серумска концентрација цитокина IL-6, а као примарни независни, узрочни фактор- терминална бубрежна инсуфицијенција. На

основу серумске концентрације цитокина IL-6 код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом која је износила 3.79 ± 0.37 pg/mL и концентрације истог цитокина код здраве контроле, а која је износила 2.3 ± 0.05 pg/mL, потребна величина узорка за ниво значајности $\alpha=0,05$ и статистичку моћ теста $1-\beta$ од 80% израчуната је потребна величина узорка од 40. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

Статистичка обрада података

За статистичку обраду добијених резултата користиће се комерцијални програмски пакет SPSS (v.20.0, SRSS Inc., Chicago, IL). За анализу добијених података, користићемо: методе дескриптивне статистике, независан T тест и/или Mann-Whitney тест, Fisher тест и Pearson и/или Spearman коефицијент корелације. Статистички метод израчунавања критичне вриједности, како би се утврдио исход неког догађаја, биће одређиван ROC кривом и израчунавањем сензитивности и специфичности за сваки од испитиваних параметара. Дефинитивни избор статистичких метода зависиће од природе добијених података. Праг значајности (α) за сва статистичка израчунавања биће 0,05.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Оштећење ткива током HCV инфекције последица је имунског одговора на вирус. Терминална бубрежна инсуфицијенција води у имуносупресију. Пацијенти са ТБИ следствено ће имати слабији анти-вирусни имунски одговор и блаже оштећење јетре, у односу на пацијенте без ТБИ, што би потврдило биохемијске анализе функције јетре. Мерењем релевантних цитокина у серуму пацијената указаће се на измењен системски имунски одговор. Очекује се да пацијенти са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом имају другачији цитокински профил и самим тим другачији антивирусни одговор што би објаснило разлику у тежини HCV инфекције.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Испитивањем пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и хепатитисом С као и пацијената са само хепатитисом С, односно само терминалном бубрежном инсуфицијенцијом, анализом биохемијских параметара функција јетре, маркера вирусне инфекције и релевантних цитокина у серуму пацијената испитаће се утицај терминалне бубрежне инсуфицијенције на оштећење јетре и тежину хепатитиса С.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 Axis in Innate and Acquired Immunity to Tumors, *OncoImmunology* 2012; 1(2): 229-231.
2. Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells, *Int J Cancer* 2014; 134(7): 1669-16682.
3. Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Zdravkovic N, Mitrovic S, Arsenijevic N. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma, *Int J Med Sci* 2014; 11(9): 936-947.
4. Borovcanin M, Jovanovic I, Djukic Dejanovic S, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic M. Increase systemic levels of IL-23 as a possible constitutive marker in schizophrenia, *Psychoneuroendocrinology* 2015; 56: 143-147.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Имунологија, инфекција, инфламација

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **проф. др Маја Ћупић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, члан

3. **проф. др Жељко Мијаиловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан
4. **проф. др Дејан Петровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан
5. **доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Ружице Лукић, Комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај терминалне бубрежне инсуфицијенције на тежину оштећења јетре код хепатитис С вирусне инфекције и на модулацију антивирусног имунског одговора.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Ружице Лукић бити од великог научног и практичног значаја у смислу истраживања разлога потенцијално блажег оштећења јетре код хепатитис С вирусне инфекције, код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Ружице Лукић **„Хепатитис С и параметри инфламацијског одговора код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
-

2. **проф. др Маја Ћупић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, члан
-

3. **проф. др Жељко Мијаиловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан
-

4. **проф. др Дејан Петровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан
-

5. **доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
-

У Крагујевцу, 30.08.2016.