

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Изборног веће Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног Већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-6270/3-11 од 21.09.2011.године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Вук Р. Вуковића** под називом:

“Квантификација FoxP3+ Т лимфоцита и повезаност са степеном инфламације током хроничне HCV инфекције”

Чланови комисије су:

1. Проф. др Миодраг Лукић, председник, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. Проф. др Предраг Чановић члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу област Инфективне болести, члан;
3. Проф. др Миодраг Чолић члан, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи:

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат **др мед. Вук Р. Вуковић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

А. Лични подаци

Др Вук Р. Вуковић рођен је 01. августа 1970. године у Пећи, где је завршио основну и средњу школу. Медицински факултет у Крагујевцу завршио је 1996. године. По обављању лекарског стажа и полагања стручног испита, ради као лекар опште праксе у Гарнизонској амбуланти у Крагујевцу. У току 2003. године, бива упућен на последипломске студије облика специјализације група Интерне Клинике – општа медицина на ВМА, коју завршава 2007 године. Од 2007. године налази се на месту

Управника ГА Крагујевац, у чину мајора. Докторске академске студије смер Имунологија, инфекција и инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу уписује 2007. године. Усмени докторантски испит положио је 31.10.2009. године, оценом 10 (десет).

Б. Подаци о објављеним радовима

Б.1. Часописи националног значаја (категорија М50)

Вуковић В, Мијаиловић Ж и Боровчанин Н. Epstein-Barr вирусни хепатитис са појавом иктеруса. Медицински часопис. 2010; 1: 14-18.

М53 1 бод

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Квантификација FoxP3+ Т лимфоцита и повезаност са степеном инфламације током хроничне HCV инфекције”

Промена наслова: “Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције”

Предмет

Ова студија ће се бавити утврђивањем присуства Т регулаторних лимфоцитита у јетри и периферној крви и њиховог утицаја на степен оштећење ткива јетре код пацијената са хроничном HCV инфекцијом.

Хипотезе студије

1. Пацијенти са хроничном HCV инфекцијом имају већи број регулаторних Т лимфоцита у периферној крви који снажније испољавају PD-1 и STAT молекуле у односу на здраве особе.
2. Код пацијената са хроничном HCV инфекцијом постоји доминација Th17 имунског одговора у односу на Th1 имунски одговор.
3. Код пацијената са хроничном HCV инфекцијом посторији позитивна корелација између броја регулаторних Т лимфоцита у крви и јетри са бројем RNK копија вируса.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат је положио усмени докторски испит 31.10.2009. год. са оценом 10 (десет) и објавио један рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Претпоставља се да око 170 милиона људи широм света, има хроничну хепатитис Ц вирусну (HCV) инфекцију. Међутим ова инфекција је доказана само код 25% инфицираних јер су симптоми болести или одсутни или некарактеристични, те се открива најчешће случајно приликом рутинског тестирања крви. Најзначајнију дијагностичку вредност имају повишене активности *серумских аминотрансфераза (AST/ALT)*. Геном HCV показује велику хетерогеност, што се тумачи великим бројем грешака у процесу транскрипције и недостатком репарационих механизма. Хистопатолошки налаз омогућава потврду клиничке дијагнозе, али и одређивање нумеричког степена некроинфламаторне активности (grading) и степена фиброзе (staging) што, са великом вероватноћом, указује на даљу еволуцију болести. Цитотоксични Т лимфоцити (CTL), су од кључног значаја у искорењивању вирус-инфицираних ћелија. Они су и забележени у јетри и периферној крви болесника са хроничном (HCV) инфекцијом, што са друге стране указује да CTL не могу у потпуности да елиминишу вирус, а могу допринети хроничном оштећењу јетре.

Имунски систем има развијене механизме одржавања хомеостазе, региструје сваку промену која нарушава равнотежно стање и тежи да то стање поврати. Кључну улогу у процесима регулације и модулације имунског одговора имају Т регулаторни лимфоцити (Treg). Treg представљају посебан субсет периферних CD4⁺ Т лимфоцита који коекспримира CD25 молекула (α -ланац рецептора за IL-2, IL-2R) и има кључну улогу у контроли аутореактивних Т лимфоцита. За настајање Treg фенотипа неопходне су интеракције високог афинитета између G_HC класе II и аутоантигена, али се сматра да је потребно и континуирано присуство тог антигена у високој концентрацији. За развој и опстанак Treg ћелија неопходно је присуство IL-2, TGF β , сигнали са CD28, CTLA-4, CD40, али најзначајнију улогу у настанку ових ћелија има експресија FoxP3 молекула. FoxP3 је транскрипциони фактор који припада *forkhead* фамилији. Супресивна активност Treg ћелија се карактерише инхибицијом пролиферације циљних ефекторних лимфоцита. Супресивно дејство ових ћелија може бити узрок перзистенције узрочника и настанка хроничне инфекције, али истовремено, супресија инфламаторног одговора може спречити настанак проинфламаторног оштећења ткива. Супресија коју изазивају Treg индуковане HCV вирусом може да снизи имунски одговор Т ћелија у раним фазама инфекције и тако онемогући отклањање вируса, али се тиме може смањити и запаљенски инфилтрат у јетри и спречити масивно оштећење ткива. Ипак, неколико новијих студија је указало на чињеницу да перзистентна HCV индукује инфламаторни миље који карактерише повишен нив IL-6, IL-1 β и снижен ниво IFN- γ што може индуковати настанак HCV специфичних CD4⁺Th17 ћелија. Th17 лимфоцити су главни медијатори инфламаторних болести и повишен ниво IL-17 је показан код пацијената са хроничном HCV инфекцијом. Интересантно је да Th17 лимфоцити, изгледа, показују резистенцију на супресивно дејство регулаторних Т лимфоцита, те да ове ћелије могу бити одговорне за инфламаторну каскаду која доводи до фиброзе и цирозе јетре током хроничне HCV инфекције. На крају, многе студије показују да рецептор програмиране смрти-1 (PD-1 од енгл. programmed death 1 receptor) и његови лиганди негативно регулишу имунски одговор. *In vitro*, третман анти-CD3 стимулираних Т-ћелија са PD-L1-IG, резултира смањењем Т-ћелијске пролиферације и

IFN- γ секреције. Смањена Т-ћелијска пролиферација је у корелацији са ослабљеном секрецијом IL-2, који се могу опоравити додавањем анти-CD28 антитела или егзогеног IL-2. Заједно, ови подаци указују на то да PD-1 негативно регулише Т ћелијски одговор.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљ: Утврдити присуство и одредити апсолутни и релативни број CD4+/CD25+/Foxp3+ (Treg), CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцита у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом, испитати цитокински профил (Th1/Th17) имунског одговора у хроничној HCV инфекцији као и постојање евентуалне повезаности ових параметара, вирусне репликације и нивоа оштећења јетриног паренхима.

У складу са општим циљевима истраживања постављени су и конкретни задаци:

- Одредити релативан број CD4+/CD25+/Foxp3+ Т лимфоцита у јетри и периферној крви испитаника, а резултат приказати као проценат CD4+/CD25+/Foxp3+ Т лимфоцита у односу на укупне CD4 Т лимфоците.
- Утврдити ниво експресије PD-1 и фосфорилације STAT-5 у CD4+/CD25+/Foxp3+ Т лимфоцитима испитаника.
- Утврдити повезаност броја CD4+/CD25+/Foxp3+, CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцита и макрофага у јетри и периферној крви са бројем HCV RNK копија, серумским нивоом ALT и AST и степеном фиброзе јетриног паренхима.
- Испитати профил секретованих цитокина (Th1/Th17) у периферној крви и 24h култури мононуклеарних леукоцита испитаника.

Значај: Хронични хепатитис Ц је дуготрајна болест јетре која може прогредирати у цирозу јетре са тешким последицама. Процењује се да ће ова тиха и подмукла пандемија резултирати максималним бројем инфицираних тек негде око 2020. године. Кључну улогу у процесима регулације имунског одговора имају Treg лимфоцити чија се супресивна активност карактерише инхибицијом пролиферације ефекторних лимфоцита. Обзиром на функцију Treg и њихов значај у превенцији масивног оштећења ткива јетре, једна од идеја које се намећу је и да модулација Treg функције може бити једна од терапијских стратегија за лечење хроничне HCV.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Досадашње студије на ову тему су тешке за интерпретацију јер нема много радова који су се бавили овом комплексном проблематиком (претраживањем дигиталне базе података Националне медицинске библиотеке САД - PubMed, коришћењем две кључне речи HCV и Treg, добија се свега 30 радова), при чему су коришћене различите методологије идентификације и фенотипизације лимфоцита у јетри и периферној крви а испитиване су различите популације оболелих. Ипак, неколико студија које су објављене у последње три године указују да су код пацијената са хроничном HCV

инфекцијом Treg акумулиране у јетри и да показују високу експресију PD-1 и фосфорилисаног STAT-5, што корелира са значајном супресијом имунског одговора и перзистенцијом вирусне инфекције.

2.7 Методе истраживања

Врста студије

Експериментално-клиничка, студија

Пацијенти

У истраживање ће бити укључени пацијенти са хроничном HCV инфекцијом. Ретроспективну групу чиниће 40 пацијената са хроничном HCV инфекцијом који су у периоду 2003-2009 лечени на инфективној клиници КЦ у Крагујевцу. Проспективну групу чиниће 24 пацијента са хроничном HCV инфекцијом и 24 здрава испитаника.

Општи протокол

Ретроспективна група: за имунохистохемијску анализу користиће се ткивни узорци јетре фиксирани 5% пуферисаним неутралним формалином, дехидрисани, просветљени, прожети парафином и укалупљени у парафин.

Проспективна група: здравим испитаницима и пацијентима из проспективне групе испитаника ће се узимати 10мл хепаринизоване периферне крви, а моноклеарни леукоцити ће се изоловати помоћу густинског градијента (Lymphoprep 1.077). Моноклеарни леукоцити и узорци плазме ће се чувати на -70°C до извођења есеја.

Лабораторијска дијагноза хроничне HCV инфекције, код испитаника ретроспективне групе, је потврђена одређивањем присуства и броја HCV RNK копија у периферној крви применом PCR технике. Истом методом ће се поставити дијагноза и код пацијената из проспективне групе.

Серумске концентрације ALT и AST су код пацијената из ретроспективне групе одређене стандардним биохемијским тестовима. Истим тестовима ће се одредити серумске концентрације ALT и AST и код испитаника проспективне групе.

Серумска концентрација цитокина (Th1/Th17) у периферној крви, као и *ex vivo* продукција цитокина (Th1/Th17) у 24h култури моноклеарних леукоцита периферне крви испитаника проспективне групе ће се одредити комерцијалним ЕЛИСА тестовима, према упутствима произвођача..

Фенотипизација Т регулаторних и других имунских ћелија у ткиву јетре и периферној крви ће се одредити методама имунохистохемије и проточне цитометрије.

Присуство и фенотип имунских ћелија (CD4+/Foxp3+ Treg, CD4+ Т лимфоцита, CD8+ Т лимфоцита, CD20+ Б лимфоцита, CD69+ макрофага, CD14-/CD11c+ дендритских

ћелија) у биоптатима јетре ће се одредити методом имунохистохемије применом технике двоструког бојења.

Проточном цитометријом, коришћењем FC500 Benchtop Cytometer, Beckman Coulter и анти-хуманих антитела, одредиће се проценат и укупан број CD4+/CD25+/Foxp3+ Treg, CD4+ и CD8+ Т лимфоцита, CD20+ Б лимфоцита, CD14+ макрофага, CD14-/CD11c+ дендритских ћелија у периферној крви испитаника.

Степен инфламације (градус) и фиброзе (стадијум) јетриног паренхима ће се одредити стандардним патохистолошким методама (хематоксилин-еозин (ХЕ) методом). Градирање перипорталне некрозе (0-10), интралобуларне некрозе (0-4) и порталне инфламације (0-4) даје сумарно градус или инфламаторни индекс (0-18). Степен фиброзе (0-4) даје стадијум или индекс фиброзе. Укупни ИФ скор се добија сабирањем вредности градуса и стадијума (0-22).

Снага студије и величина узорка. Величину узорка ретроспективне групе испитаника није било могуће израчунати обзиром да су подаци о учесталости и фенотипу Treg у биоптатима јетре и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом непознати, тј. неколико студија које су се бавиле овом проблематиком пружају податке који нису компарабилни обзиром на то да су у њима коришћене различите технике и методе идентификације Т регулаторних лимфоцита. Величина узорка проспективне групе испитаника је израчуната на основу података о вредностима концентрације ALT, IFN- γ и IL-10, публикованих у студијама сличног дизајна.

Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за т-тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак (IL-10:24, IFN- γ :10, ALT:<10), утврђен је дефинивни број испитаника према групама и он износи 24 (укупан узорак од 48). Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (т-тестом за два независна узорка или Mann-Whitney U тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 85\%$.

Статистичка обрада података. Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користићемо параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

2.8. Очекивани резултати

Анализирајући податке из литературе који се односе на истраживања у области регулације и модулације имунског одговора код пацијената са HCV и клиничких студија, можемо претпоставити да ће код пацијената са потврђеном HCV инфекцијом

релативни број CD4/CD25/Foxp3 лимфоцита у јетри бити већи него у периферној крви, те да пацијенти са хроничном HCV инфекцијом имају већи број Т регулаторних лимфоцитита у периферној крви у односу на здраве особе, да Т регулаторни лимфоцити пацијената са хроничном HCV инфекцијом имају већу експресију рецептора програмиране смрти-1 (PD-1) у односу на здраве особе. Већа учесталост Т регулаторних лимфоцитита у периферној крви и већа експресија рецептора програмиране смрти-1 (PD-1) на Т регулаторним лимфоцитима пацијената са хроничном HCV инфекцијом повезана је са вирусном перзистенцијом и нивоом оштећења јетре, тако да пацијенти који имају веће оштећење јетре (f2-f4) имају већи број РНК копија вируса и већи број Т регулаторних лимфоцитита у односу на пацијенте који имају мање оштећење јетре (f0-f1). Сходно величини студијског узорка (здрави испитаници 24, пацијенти са хроничном HCV инфекцијом 24) и броју пацијената са хроничном HCV инфекцијом који се на годишњем нивоу дијагностикују на инфективном одељењу КЦ у Крагујевцу, предвиђено је да ова студија траје 12 месеци.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Tрег представљају посебан субсет периферних CD4+ Т лимфоцита који коекспримира CD25 молекулу (α -ланац рецептора за IL-2, IL-2R) и има кључну улогу у контроли аутореактивних Т лимфоцита. Супресивна активност Tрег ћелија се карактерише инхибицијом пролиферације циљних ефекторних лимфоцита. Супресија коју изазивају Tрег индуковане HCV вирусом може да снизи имунски одговор Т ћелија у раним фазама инфекције и тако онемогући отклањање вируса, али се тиме може смањити и запаљенски инфилтрат у јетри и спречити масивно оштећење ткива. Циљ ове студије је да се утврди присуство и одреди апсолутни и релативни број CD4+/CD25+/Foxp3+ (Tрег), CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцита у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом, испита цитокински профил (Th1/Th17) имунског одговора у хроничној HCV инфекцији као и постојање евентуалне повезаности ових параметара, вирусне репликације и нивоа оштећења јетриног паренхима. Резултати ове студије би показали да пацијенти са хроничном HCV инфекцијом имају већи број Т регулаторних лимфоцитита у периферној крви у односу на здраве особе, да Т регулаторни лимфоцити пацијената са хроничном HCV инфекцијом имају већу експресију рецептора програмиране смрти-1 (PD-1) у односу на здраве особе те да је већа учесталост Т регулаторних лимфоцитита у периферној крви и већа експресија рецептора програмиране смрти-1 (PD-1) на Т регулаторним лимфоцитима пацијената са хроничном HCV инфекцијом повезана са вирусном перзистенцијом и нивоом оштећења јетре. Обзиром на функцију Tрег и њихов значај у превенцији оштећења ткива јетре, једна од идеја које се намећу је и да модулација Tрег функције, односно модулација (ауто) имунске компоненте овог хроничног обољења, може бити једна од терапијских стратегија за лечење хроничне HCV.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **Проф. др Дејана Баскића**, који је ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Проф.др Дејан Баскић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом и методологијом истраживања.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација.

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, председник, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. Проф. др Предраг Чановић члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу област Инфективне болести, члан;
3. Проф. др Миодраг Чолић члан, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Вук Р. Вуковић, испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета и законом о универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.
3. Комисија сматра да ће докторска дисертација кандидата др мед. Вука Р. Вуковића показати да постоје значајни статистички показатељи о улози Трег у перзистенцији инфекције у току HCV инфекције.
4. Комисија предлаже Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Вука Р. Вуковића, под називом: “Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Миодраг Лукић, председник, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник,

2. Проф. др Предраг Чановић члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу област Инфективне болести, члан,

3. Проф. др Миодраг Чолић члан, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан.

У Крагујевцу, 18.10.2011. године.