

УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Наставно-научном већу

ПРЕДМЕТ: Извештај комисије о израђеној докторској дисертацији кандидата Лидије Поповић Драгоњић

Одлуком Наставно-научног већа Медицинског факултета у Нишу, са седнице одржане 24.04.2014. год., а на предлог одбора за докторске дисертације, прихваћен је извештај ментора проф. др Маје Јовановић о израђеној докторској дисертацији Лидије Поповић Драгоњић, докторанта ДАС клиничка медицина из Ниша, под одобреним насловом „Активност антиоксидативних ензима еритроцита код пацијената оболелих од хроничног хепатитиса Ц, лечених пегилованим интерфероном алфа-2а и рибавирином ”.

На истој седници Наставно-научног већа именована је комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

1. Проф.др Гордана Коцић, председник
2. Проф.др Маја Јовановић, ментор и члан
3. Проф.др Снежана Бркић, члан са МФ у Новом Саду
4. Проф.др Татјана Цветковић, члан
5. Проф.др Миодраг Врбић, члан

Именована комисија након детаљног прегледа урађене докторске дисертације подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци

Тема за израду докторске дисертације Лидије Поповић Драгоњић одобрена је решењем Наставно-научног већа Медицинског факултета у Нишу, од дана 04.12.2013. године, а након сагласности Наставно-научног већа Универзитета у Нишу, од дана 27.11.2013. године. Докторанткиња је своје истраживање обавила на Клиници за инфективне болести у КЦ у Нишу, Центру за медицинску биохемију КЦ у Нишу, Клиничког центра у Нишу, лабораторији Института инфективне и тропске болести у Београду, у Институту за патологију Клиничког центра у Нишу у периоду од јула 2007. године, до јуна 2009. године.

2. Однос израђене докторске дисертације према пријављеној и одобреној теми

Докторска теза, „ Активност антиоксидативних ензима еритроцита код пацијената оболелих од хроничног хепатитиса Ц, лечених пегилованим интерфероном алфа-2а и рибавирином ", представља самосталан и оригиналан рад из области Инфектологија. Садржај истраживања се у потпуности подудара са насловом докторске дисертације, а циљеви и методологија нису мењани током спровођења истраживања.

3. Технички опис дисертације

Докторска дисертација је написана на 170 страна и састоји се из следећих делова: Увода и седам следећих поглавља: 1. Преглед литературе, 2. Циљеви истраживања, 3. Научна хипотеза, 4. Испитаници, материјал и методе, 5. Резултати истраживања, 6. Дискусија, 7. Закључци, Литературе, Списка скраћеница, Биографије аутора, Изјава аутора. Дисертација садржи 38 табела, 11 графикана и 4 слике.

4. Садржајна структура докторске дисертације

Израђена докторска дисертација представља оригиналан и самосталан научно-истраживачки рад, у коме су јасно представљени циљеви, који у потпуности одговарају задатој теми.

У Уводу је наглашен значај унапређивања дијагностичког и терапијског протокола за инфекцију хепатитис Ц вирусом (ХЦВ) као и допуне сазнања о патофизиолошким механизмима ХЦВ инфекције.

У поглављу Преглед литературе описани су следећи елементи вируса и инфекције: историјат хепатитис Ц вирусне инфекције, структура вируса, епидемиологија, облици и прогресија болести, екстрахепатичне манифестације, репликација вируса, имунопатогенеза болести, дијагноза, терапија, оксидативни стрес у хроничној хепатитис Ц вирусној инфекцији.

У поглављу Циљеви истраживања јасно је одређено 4 циља тј, испитивање активности антиоксидативних ензима код свих пацијената са хроничним хепатитисом Ц (ХХЦ) као и специфичних група (у односу на генотип, број вирусних копија, постигнут одговор на терапију, степен фиброзе) пре и после терапије као и одређивање предиктивне вредности ензима.

У поглављу Научна хипотеза описано је да код пацијената са ХХЦ, пре третмана пегилованим интерфероном алфа-2а и рибавирином, има разлике у активности антиоксидативних ензима, супероксид димутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx), у односу на здраве добровољце, те да постоји промена активности по завршетку терапије (узимајући у обзир све пацијенте са ХХЦ, као и посебне категорије, у односу на генотип вируса, степен фиброзе, базични вирал лод, постизање стабилног вирусолошког одговора (SVR)).

У поглављу Материјал и методе, детаљно је описан методолошки приступ коришћен у изради докторске дисертације. Пацијенти: Студија је била проспективна. У истраживање је иницијално било укључено 60 испитаника са хроничним хепатитисом Ц и 56 здравих испитаника. Селекција испитаника који су укључени у студију извршена је на основу критеријума за увођење на стандардну терапију пегинтефероном α -2а (PEG IFN α -2а) и рибавирином (RBV) и додатних критеријума у складу са

актуелним истраживањем. По пристизању резултата патохистолошке анализе биоптата јетре, седморо пацијената није имало започет процес фиброзе у јетри, како по тадашњим критеријумима нису могли да започну терапију - њихови резултати нису узети у обзир. У додатне, шире критеријуме за укључење дизајниране у складу са тематиком истраживања, спадало је одсуство свих акутних или хроничних, медицинских стања која би додатно реметила оксидативно-антиоксидативни статус поред ХЦВ инфекције. Контролну групу су чинили здрави добровољци оба пола и истих година као и испитивани болесници. Њима је у циљу истраживања узимана само крв ради одређивања активности антиоксидативних ензима. Од свих пацијената и добровољаца тражио се писмени пристанак ради учешћа у истраживању и спровођења терапије. Свим потенцијалним кандидатима за терапију, узимана је крв ради квалитативне, квантитативне (viral load) детерминације ХЦВ РНК (PCR) као и генотипизације, на основу претходно серолошки доказане ХЦВ позитивности (ELISA). Пацијентима са доказаним хроничним хепатитисом Ц (присуство ХЦВ РНК у крви) урађена је биопсија јетре, ради патохистолошке евалуације прогресије болести (одређивање степена фиброзе). Пацијентима који су се квалификовали за терапију је на основу одређеног генотипа спроведен и различит терапијски режим у погледу трајања лечења. Крв за анализу узимана је према стандардизованим смерницама овог терапијског режима. Пре почетка терапије пацијентима је узимана крв ради одређивања базичних активности антиоксидативних ензима, као и осталих параметара рутинских биохемијских и хематолошких анализа у оквиру стандардних процедура лечења. Пацијенти са генотипом 2 и 3 примали су PEG IFN α -2а субкутаном инјекцијом једном недељно, а RBV пер ос свакодневно, у току 24 недеље терапије. Пацијенти са генотипом 1 и 4 примали су PEG IFN α -2а субкутаном инјекцијом једном недељно, а RBV пер ос, свакодневно, у току 48 недеља терапије. Дозирање терапије било је исто код обе групе генотипова, и то пегинтерефрона α -2а у дози од 180 μ г недељно, рибавирин 1000-1200 мг дневно. Смањење дозе лекова било је планирано и дозвољено у случају пада вредности хемоглобина на испод 100 g/L, полиморфонуклеара испод $0.75 \times 10^9/L$, тромбоцита испод $50 \times 10^9/L$. Према смерницама за терапију и евалуацију лечења PEG IFN α -2а и RBV, узимана је крв ради анализе 24 недеље по завршетку терапије, у циљу утврђивања постизања SVR. У исто време узимана је и крв ради одређивања активности антиоксидативних ензима. Методе: Вршене су анализе основних и општих података о испитаницима, стандардне биохемијске и хематолошке анализе крви (комплетна крвна слика, параметри акутног запаљења- седиментација еритроцита и високо сензитивни Ц-реактивни протеин, high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), параметри теста функције јетре, тестови бубрежне функције, алфа фетопропротеин), одређивање активности антиоксидативних ензима – SOD, CAT и GPx, серолошко утврђивање ХЦВ, квалитативно и квантитативно одређивање ХЦВ РНК, перкутана слепа аспирациона биопсија јетре и патохистолошка евалуација узорка јетре. Одређивање активности SOD, CAT и GPx вршено је у хемализату еритроцита који је начињен из суспензије еритроцита хепаринизоване крви додатком хладне редестиловане воде и чуван на -20°C до одређивања активности ензима. Активност CAT одређивана је кинетичком методом по Беутлеру (1982). Метода се заснива на разградњи водоник пероксида која се прати падом апсорбанце на 230 нм у сто пута разблаженом примарном хемализату еритроцита. Активност ензима се изражава у јединицама на грам хемоглобина $\times 10^4$ (U/gHb $\times 10^4$). Мерење активности каталазе вршено је на спектрофотометру DU 650 фирме Beckman (Beckman, USA). Активност SOD одређивана је комерцијалним тестом Ransod, фирме Randox (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Co.Autrium, UK) на аутоматском анализатору Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan). Принцип ове методе је инхибиција супероксида да реагује

са 2-(4-јодофенил)-3(4-нитрофенол)-5-фенилтетразолијум хлоридом и награди обојени формазан. За генерисање супероксида користи се систем ксантин/ксантин оксидаза. Активност SOD се изражава интернационалним јединицама на грам хемоглобин (U/gHb), а референтни интервал износи 1092-1817 U/gHb. Активност GPx одређивана је комерцијалним тестом Ransel, фирме Randox (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Co.Autrium, UK). Ransel тест се заснива на принципу методе Paglia и Valentine (1967), у којој глутатион пероксидаза катализује оксидацију редукованог глутатиона кумен хидропероксидом. У присуству глутатион редуктазе и NADPH оксидовани глутатион се одмах преводи у редуковани облик уз истовремену оксидацију NADPH до NADP+ што је праћено падом апсорбанце на 340 nm. Активност ензима се изражава у јединицама на грам хемоглобин. Референтне вредности износе 29,6 до 82,9 U/gHb. По већ утврђеним стандардним протоколима рутински су вршени: одређивање стандардних биохемијских параметара и параметара коагулационог статуса, патохистолошка обрада и евалуација, вирусолошке анализе. Статистичка обрада вршена је у програмском пакету SPSS 16.0. следећим методама: апсолутни бројеви, релативни бројеви (%), аритметичка средина (\bar{X}), стандардна девијација (SD), медијана, интерквартилна разлика, Колмогоров-Смирновим тестом, t тестом или Mann Whitneyevim U тестом, анализа варијансе (ANOVA), Kruskal-Wallis тест, Tukijev тест, χ^2 тест и Fisherov тест егзактне вероватноће, одређиван је коефицијент прости линеарне корелације (r) или Спирманов коефицијент ранг корелације, логистичка регресиона анализа. Статистичка хипотеза тестирана је на нивоу сигнификантности за ризик од $\alpha=0,05$, тј. разлика међу узорцима сматра се значајном ако је $p<0.05$.

У поглављу Резултати описано је да су претерапијске активности SOD, GPx и CAT статистички значајно ниже код пацијената са ХХЦ у поређењу са здравим испитаницима ($p<0,001$) а после терапије су статистички значајно више ($p<0,001$). Статистички је значајна позитивна корелација између активности SOD, GPx и CAT, пре и после терапије ($p<0,001$) и са аминотрансферазама после терапије ($p<0,001$). После терапије, једино активност GPx статистички значајно негативно корелира са аминотрансферазама ($p<0,001$). Резултати криве оперативних карактеристика примаоца за SOD, GPx и CAT јесу: површина испод криве редом од 0,975; 0,988; 0,817; сензитивност редом 93,5%, 71,7%, 100% и специфичност 100% за сва три ензима. Четрдесет шесторо пацијената са постигнутим SVR имају значајно повећање активности SOD, GPx и CAT ($p<0.001$ за сва три ензима), седморо су без постигнутог SVR ($p=0.31$, $p=0.717$, $p=0.85$ редом). Статистички су значајно нижи нивои SOD, CAT, GPx ($p<0.001$ за сва три ензима) пре и после терапије код пацијената: са хепатитис Ц вирусним генотипом 1 и 4 у односу на генотипове 2 и 3, вишег степена фиброзе јетре у односу на нижи, који ће постићи SVR у односу на оне који неће. Статистички значајно је повишен ниво hsCRP код оболелих од ХХЦ са сниженим активностима антиоксидативних ензима ($p<0.05$).

Поглавље Дискусија, даје детаљну анализу резултата спроведеног истраживања, уз поређење са подацима добијеним радовима других аутора. Дискусијом се појашњава улога оксидативног стреса посматраног кроз нарушени антиоксидативни баланс у патогенези хроничног хепатитиса Ц, доводећи у везу посебно издвојене категорије (генотип вируса, степен фиброзе, постигнут SVR), као и инфламацију као неодвојиви део оксидативног стреса. У дискусији се објашњава и улога антиоксидативних ензима у предвиђању успеха терапије те проширење већ постојећих модела за предикцију.

У поглављу Закључци, у дванаест тачака су на концизан начин наведени закључци обављеног истраживања:

1. Статистички су значајно нижи нивои активности антиоксидантних ензима (SOD, CAT, GPx) код пацијената са ХХЦ пре третмана у односу на контролну групу.
2. Пацијенти са ХХЦ по завршетку терапије имају статистички значајно вишу активност SOD, CAT, GPx у односу на активност истих пре започињања терапије.
3. Вредност антиоксиданата код пацијената са ХХЦ после терапије је и даље снижена у односу на групу здравих испитаника.
4. Пацијенти са ХЦВ генотипом 1 и 4 имају статистички значајно ниже нивое SOD, CAT, GPx у односу на пацијенте ХЦВ генотипа 2 и 3, пре терапије.
5. Пацијенти са ХЦВ генотипом 1 и 4 имају статистички значајно ниже нивое SOD, CAT, GPx у односу на пацијенте ХЦВ генотипа 2 и 3, после терапије.
6. Пацијенти вишег степена фиброзе јетре имају статистички значајно ниже нивое SOD, CAT, GPx у односу на пацијенте нижег степена фиброзе, пре терапије.
7. Пацијенти вишег степена фиброзе јетре имају статистички значајно ниже нивое SOD, CAT, GPx у односу на пацијенте нижег степена фиброзе, после терапије.
8. Пацијенти са ХХЦ који ће постићи SVR, имају статистички значајно више вредности SOD, CAT, GPx од пацијената који неће постићи SVR.
9. Ниво базичног viral loada негативно корелира са базичном активношћу антиоксидативних ензима, мада у недовољној мери да би се потврдио исти патогенетски принцип.
10. Постоји статистички значајна корелација између базичних и посттерапијских активности SOD, CAT, GPx, која би указала на исти патогенетски принцип настанка ХХЦ.
11. Поменути антиоксидативни ензими имају предиктивну вредност у процени постизања SVR, као и високу сензитивност и специфичност. Од значаја би било укључити базичне активности SOD, CAT, GPx у мултифакторијелни модел предикције исхода терапије ХХЦ.
12. Неочекивано, hsCRP издвојио се као параметар чије су вредности изван референтног опсега примећене код оболелих од ХХЦ са сниженим активностима антиоксидативних ензима. То је још један показатељ повезаности системске инфламације и оксидативног стреса у патогенези ХХЦ.

У поглављу Литература, наведени су радови који су коришћени у изради докторске дисертације. У оквиру литерарних података, велики удео имају студије новијег датума, односно актуелна сазнања везана за разумевање патогенезе ХХЦ посматране кроз постојање оксидативног стреса, као и смернице за дијагностику и лечење.

На основу изнетих података, Комисија доноси следећи

ЗАКЉУЧАК

Докторска дисертација Лидије Поповић Драгоњић под насловом „Активност антиоксидативних ензима еритроцита код пацијената оболелих од хроничног хепатитиса Ц, лечених пегилованим интерфероном алфа-2а и рибавирином " израђена је поштовањем савремених принципа научно-истраживачког рада и представља актуелну и научно засновану студију. Кандидат је показао способност конципирања истраживања, коришћења методологије и литературе на адекватан начин, односно интерпретирања добијених резултата. Циљеви истраживања су постављени на одговарајући начин, а коришћењем актуелне, савремене методологије добијени су примењиви и корисни резултати. Докторска дисертација Лидије Поповић Драгоњић представља оригиналан научни рад из области Инфектологије. Формулација закључака у дисертацији јасно даје одговоре на постављене циљеве истраживања.

Због свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Универзитета у Нишу да усвоји позитивну оцену израђене докторске дисертације и да Лидији Поповић Драгоњић одобри јавну одбрану.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. Проф.др Гордана Коцић, председник

Гордана Коцић

2. Проф.др Маја Јовановић, ментор и члан

Маја Јовановић

3. Проф.др Снежана Бркић, члан са МФ у Новом Саду

Снежана Бркић

4. Проф.др Татјана Цветковић, члан

Проф.др Т. Цветковић

5. Проф.др Миодраг Врбић, члан

Миодраг Врбић