

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**ПРЕДМЕТ:**

**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 26.11.2014. године, одлуком 01-1289313-1 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције**“ кандидата др Вука Р. Вуковића у следећем саставу:

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Предраг Чановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан
3. **Проф. др Миодраг Чолић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Вука Р. Вуковића и подноси Наставно-научном већу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области**

Докторска дисертација кандидата др Вука Р. Вуковића под називом „Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне HCV инфекције“, представља оригиналну студију која се бавила испитивањем присуства и фреквенције имунских ћелија (Treg, CD4+, CD8+, CD20+, CD14+, DC-SIGN+) у јетри и периферној крви и испитивањем цитокинског профила (Th1/Th2/Th17) имунског одговора код пацијената са хроничном HCV инфекцијом, као и постојањем евентуалне повезаности ових параметара, вирусне репликације и нивоа оштећења јетриног паренхима.

Ова студија показује да је прогресија хроничне HCV инфекције праћена снижењем броја Т и В лимфоцита и DC периферне крви, повећањем броја Treg у јетри и алтерацијом

цитокинског профила, од доминантно проинфламаторног код пацијената без фиброзе, до супресије како проинфламаторних, тако и антиинфламаторних цитокина, уз појачан IL-4 цитокински одговор, код пацијената са узнапредовалом фиброзом. Сумарно, ова студија указује на стишавање имунског одговора током курса болести.

Хронични хепатитис Ц је дуготрајна болест јетре која може прогредирати у цирозу јетре са тешким последицама. Имуни одговор који се развија током HCV инфекције првенствено захтева ангажовање цитотоксичних Т лимфоцита (CTL) лимфоцита и његова ефикасност у многоме зависи од продукције проинфламаторних цитокина. Вирус специфични CTL имају кључну улогу у елиминацији вируса и њихово присуство је потврђено у јетри и периферној крви болесника са хроничном (HCV) инфекцијом. Са друге стране, интрахепатични CTL могу допринети и хроничном оштећењу паренхима јетре. Значајну улогу у антивирусној имуности имају такође и CD4<sup>+</sup> Th лимфоцити које се, на основу способности да секретују различите цитокине, могу поделити на више функционалних фенотипова: Т хелпер 1 (Th1), Т хелпер 2 (Th2) Т хелпер 17 (Th17) и регулаторни Treg лимфоцити. Поларизација Th лимфоцита има вишеструки утицај на антивирусни одговор. Сматра се да централну улогу у поларизацији имунског одговора имају цитокини, који својим дејством на друге ћелија, регулишу имунски одговор. Кључну улогу у процесима регулације и модулације имунског одговора на HCV имају Т регулаторни лимфоцити. За развој и опстанак Treg најзначајнију улогу има експресија FoxP3 транскрипционог фактора. 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. Такође, неколико новијих студија је указало на чињеницу да перзистентна HCV инфекција индукује инфламаторни миље који карактерише повишен ниво IL-6, IL-1 $\beta$  и снижен ниво IFN- $\gamma$  што може индуковати настанак HCV специфичних CD4<sup>+</sup> 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. Ипак, литературни подаци углавном указују на дуалну природу HCV индукованог Treg одговора који у неким ситуацијама може да снизи имунски одговор Т ћелија у раним фазама инфекције и тако омогући перзистенцију вируса, док алтернативно, активација Treg у каснијим фазама инфекције може смањити запаљенски инфилтрат у јетри и спречити масивно оштећење ткива.

Повезаност присуства и фреквенције Treg у јетри и периферној крви и цитокинског профила (Th1/Th2/Th17) имунског одговора код пацијената са хроничном HCV инфекцијом са нивоом оштећења јетриног паренхима до сада није испитана. Обзиром да поларизација Th лимфоцита има вишеструки утицај на антивирусни одговор испитана је повезаност цитокинског профила и фреквенције Treg са степеном инфламације (степен) и фиброзе (стадијум) јетриног паренхима

## **2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области**

Прегледом литературе и увидом у биомедицинску базу података "Medline" помоћу следећих кључних речи: hcv th1 th2 th17 "HCV", "Treg", "Th1", "Th2" и "Th17" утврђено је да до сада није спроведена студија сличног дизајна у којој је анализирана повезаност цитокинског профила и фреквенције Treg са степеном инфламације (степен) и фиброзе (стадијум) јетриног паренхима. На основу тога Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Вука Р. Вуковића под називом „Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне HCV инфекције“, представља резултат оригиналног научног рада, који указује на могуће механизме модулације имунског одговора током перзистентне HCV инфекције.

## **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

**А.** Кандидат др Вук Р. Вуковић, остварио је 9 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета.

### **Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

Научни радови објављени у целини у часописима :

- 1. Vuković V, Baskić D, Mijailović Ž et al.** Association between risk factors, basal viral load, virus genotype and the degree of liver fibrosis with the response to therapy in patients with chronic HCV infection. *Vojnosanit Pregl*, vol.72 June (No.6) 2015 (in press). **(M23-3 бода)**
- 2. Baskić D, Popović S, Banković D, Arsović A, Vuković V, Zelen I, Đurđević P.** Evaluation of inflammatory biomarkers as helping diagnostic tool in patients with breast cancer. *Cancer Biomark* 2014; 14(6): 401-408. doi: 10.3233/CBM-140426. **(M23-3 бода)**
- 3. Vuković V, Baskić D, Mijailović Ž et al.** Terapija hronične HCV infekcije - povezanost prediktivnih faktora i virusološkog odgovora. *Med Čas (Krag)* 2014; 48(3): 113-121. doi:10.5937/mckg48-5925. **(M53-1 бод)**
- 4. Vuković V, Mijailović Ž, Borovčanin N.** Epstein-Barr virusni hepatitis sa pojavom ikterusa. *Med Čas* 2010; 1: 14-18. **(M53-1 бод)**

## **2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему**

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и добијени резултати рад су у највећој мери исти. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном.

Докторска дисертација др Вука Р. Вуковића под називом „Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције“ садржи сва неопходна поглавља: Увод, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература. Рад има 161

страну, садржи 39 слика, 7 графикана, 14 табела а у поглављу Литература је цитирано 378 референци из савремене домаће и иностране литературе.

У уводном делу кандидат сажето разматра садашњи ниво сазнања о испитиваној теми и о значају изабране теме за медицинску науку, затим истиче непознанице о теми и повезује их са темом свог рада. Јасно су изложени циљеви и конкретни задаци, при чему је основни циљ да се утврди повезаност Treg, CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцита у јетри и периферној крви и цитокинског профила (Th1/Th17) имунског одговора код пацијената са хроничном HCV инфекцијом са вирусном репликацијом и нивоом оштећења јетриног паренхима. У складу са општим циљевима истраживања постављени су и конкретни задаци: Одредити релативан број Treg лимфоцита у јетри и периферној крви испитаника, а резултат приказати као проценат Treg лимфоцита у односу на укупне CD4 Т лимфоците; Утврдити ниво експресије PD-1 и фосфорилације STAT-5 у Treg лимфоцитима испитаника; Утврдити повезаност броја Treg 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.

Материјал и методологија рада су подударни са наведеним у пријави дисертације, презентовани су на одговарајући начин и врло прецизно. Детаљно су описане све технике коришћене у студији: узимање билоошких узорака, патохистолошка евалуације степена активности хепатитиса и стадијума фиброзе, анализа популација мононуклеарних ћелија јетре методом имунохистохемије, анализа популација мононуклеарних ћелија периферне крви методом проточне цитометрије, мерење концентрације цитокина у серуму испитаника методом проточне цитометрије, као и статистичке методе коришћене за анализу резултата.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани са 12 табела, 7 графикана, 29 слика. Анализом заступљености и фреквенције Treg лимфоцита и других имунских ћелија показано је да је прогресија хроничне HCV инфекције ка терминалном оштећењу јетре удружена са смањењем броја Т и В лимфоцита и DC периферне крви, повећањем броја Treg у јетри и алтерацијом цитокинског профила, од доминантно проинфламаторног, код пацијената без фиброзе, до супресије како проинфламаторних, тако и антиинфламаторних цитокина, уз појачан IL-4 цитокински одговор, код пацијената са узнапредовалом фиброзом.

У поглављу Дискусија представљена је анализа добијених резултата и њихово поређење са литературним подацима из ове области. Резултати су дискутовани у контексту мултипле природе HCV индукованог имунског одговора који, иако одговоран за елиминацију вируса, када је супримиран у раним фазама инфекције може бити узрок перзистенције узрочника и настанка хроничне инфекције, док алтернативно, активација Treg у каснијим фазама инфекције може смањити запаљенски инфилтрат у јетри и спречити масивно оштећење ткива. При томе су наведени ставови из најзначајнијих оригиналних и ревијских научних радова поменуте области.

Литература је адекватна по обиму и садржају. Цитиране су 378 библиографске јединице из домаћих и иностраних стручних публикација.

## **2.5. Научни резултати докторске дисертације**

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Већа инциденца HCV инфекције међу испитаницима мушког пола. Најчесталији фактор ризика за HCV инфекцију је ИВУПАС. Највећа заступљеност генотипа 1.
2. Повољан одговор на терапију је забележен код три четвртине испитаника, док је неповољан одговор имало свега једна четвртина испитаника.
3. Испитаници ИВУПАС групе су у 80% случајева мушкарци, млађе животне доби, са нижом базалном виремијом, доминантним присуством генотипа 3, нижим стадијумом фиброзе јетре и бољим терапијским одговором.
4. Испитаници који су заражени трансфузијом или дијализом показују равномерну полну дистрибуције, старије су животне доби, са вишом виремијом, доминантним присуством генотипа 1, вишим стадијумима фиброзе и лошијим одговором на терапију.
5. Развој виших стадијума фиброзе зависи од старости испитаника, тако да свака година живота повећава шансу за настанак тешке фиброзе за 9,5%. Генотип 2 носи око 7 пута мањи ризик за настанак теже фиброзе од генотипа 1.
6. Шанса за добар терапијски одговор смањује за 3.5 % са сваком годином живота. Трансфузија, у односу на ИВУПАС, смањује шансу доброг одговора око 5 пута, док хемодијализа, у односу на ИВУПАС, смањује шансу доброг одговора око 4 пута. Виши стадијуми фиброзе (F3-F4) смањују шансу доброг одговора око 4 пута.
7. Пацијенти са повољним одговором на терапију имају значајно већи број CD4+ и Foxp3+ ћелија у односу на пацијенте са неповољним одговором. Са друге стране у групи пацијената са неповољним одговором на терапију забележен је већи број CD8+ ћелија.
8. Пацијенти са вишим стадијумима фиброзе (F3) имају значајно већи број CD4+, Foxp3+, CD8+ и CD20+ ћелија у односу на пацијенте без фиброзе. Насупрот томе, број DC-SIGN+ ћелија је значајно виши у групи пацијената без фиброзе.
9. Код пацијената без фиброзе (F0) серумски нивои свих цитокина су виши у односу на контролне здраве субјекте, при чему доминирају проинфламаторни цитокини. Код пацијената са унапредовалим стадијумом фиброзе серумски нивои свих цитокина, осим IL-4, су нижи у односу на пацијенте без фиброзе
10. Продукција проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у све три групе пацијената (F0, F1, F3) је после терапије значајно смањена.
11. Број Foxp3+ ћелија, процентуална заступљеност у популацији CD4+ ћелија, као и број CD19+ ћелија су виши у односу на контролу и код пацијената са нижим стадијумима фиброзе (F0-F1) и код пацијената са вишим стадијумима фиброзе (F2-F3).
12. У периферној крви пацијената број активираних плазмоцитоидних дендритских ћелија значајно је већи од броја активираних мијелоидних дендритских ћелија.

## **2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси**

Резултати овог истраживања по први пут показују повезаност заступљености и фреквенције Трег лимфоцита и цитокинског профила са стадијумима оштећења јетре код

пацијената са хроничном HCV инфекцијом. Повећан број Treg у јетри и алтерација цитокинског профила од доминантно проинфламаторног преко супресије како проинфламаторних тако и антиинфламаторних, до преваге IL-4 цитокинског одговора код пацијената са узнапредовалом фиброзом указује на имуносупресију и „гашење“ имунског одговора имунског одговора током курса болести. Обзиром да цитокини имају централну улогу у поларизацији имунског одговора, а да кључну улогу у процесима регулације и модулације имунског одговора на HCV имају Treg лимфоцити, једна од идеја које се намећу је и да модулација Treg функције може бити једна од терапијских стратегија за лечење хроничне HCV.

## **2.7. Начин презентирања резултата научној јавности**

Део истраживања ове докторске студије је објављен у часопису националног уначаја, док је један рад прихваћен за публикавање у часопису од међународног значаја. У припреми су још четири рада од којих су два планирана за публикавање у часописима од међународног значаја, а два у часописима националног значаја.

## **ЗАКЉУЧАК**

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Вука Р. Вуковића под називом „Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора

са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције“ на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Вука Р. Вуковића урађена под менторством проф. Дејана Баскића, представља оригинални научни рад и има велики научни и практични значај у разумевању улоге регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора током хроничне HCV инфекције.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „**Повезаност броја регулаторних Т лимфоцита и имунског одговора са степеном вирусне репликације током хроничне ХЦВ инфекције**“, кандидата др Вука Р. Вуковића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

#### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

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

---

**Проф. др Предраг Чановић**, редовни професор  
Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести,  
члан

---

**Проф. др Миодраг Чолић**, редовни професор  
Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у  
Београду за ужу научну област Имунологија, члан

---

Крагујевац, 16.03.2015.