

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

1. Одлука Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-7479/3-9 од 10.10.2012.године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Александре Д. Арсовић** под називом:

“Имунопатогенетски механизми перзистенције хламидија у гениталном тракту жена”

Чланови комисије су:

1. Проф. Др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. Доц. др Александра Димитријевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.

На основу увида у приложену документацију, комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу следећи:

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат **др мед. Александра Д. Арсовић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

А. Лични подаци

Др Александра Д. Арсовић рођена је 14. октобра 1974. године у Скопљу, БЈР Македонија. Медицински факултет Универзитета у Приштини - Косовска Митровица завршила је 30.05.2005 године са просечном оценом 8.08. Лекарски стаж обавила је у Општој болници, Здравственог центра у Косовској Митровици, током 2005-2006 године, а стручни испит је положила 29.01.2007 године. Радни однос на Медицинском

факултету Универзитета у Приштини - Косовска Митровица засновала је 01.10.2006 године као сарадник у настави на предмету микробиологија и имунологија. Специјализацију из Микробиологије са паразитологијом уписала је 2007 године на Медицинском факултету Универзитета у Приштини - Косовска Митровица, а специјалистички испит положила 21.10.2010 у Нишу са оценом 5 (одличан). У звање асистента на предмету Микробиологија и имунологија изабрана је 01.06.2011 године. Докторске академске студије смер Имунологија, инфекција и инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу уписује 14.12.2006. године. Усмени докторантски испит положила је 13.11.2008. године, оценом 7 (седам).

Б. Подаци о објављеним радовима

Б.1. Часописи националног значаја (категорија М50)

1. **Арсовић А**, Радић И, Савић С, Илић Б, Баскић Д. Регулаторни Т лимфоцити. *Praxis Medica* 2010; 38(1-2): 137-142. **М53 1.0 бод**

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Имунопатогенетски механизми перзистенције хламидија у гениталном тракту жена”

Предмет

Студија ће се бавити имуно-патогенетским механизмима који се налазе у основи перзистентне хламидијалне инфекције тј., испитивањем функционалних и фенотипских карактеристика мононуклеарних леукоцита испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом, као и евентуалном повезаношћу ових параметара са нивоом перзистенције хламидијалне инфекције.

Хипотезе студије

1. Учесталост инфекција *C. trachomatis* је чешћа код инфертилних жена.
2. Највиши титар анти-сHSP-60 и анти-сHSP10 специфичних антитела имају испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом;
3. Серумски ниво IFN- γ и IL-10 је виши код испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом;
4. Заступљеност рDC и Т-лимфоцита који продукују високе количине IL-10 у периферној крви је највећа код испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом;
5. Заступљеност рDC и Т-лимфоцита који продукују високе количине IL-10 у мукози цервикса је највећа код испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом;

2.3. Подобност кандидата

Кандидат је положио усмени докторски испит 13.11.2008. год. са оценом 7 (седам) 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

Chlamydia trachomatis је најчешћи сексуално преносиви бактеријски узрочник широм света. Код жена, инфекција *C. trachomatis* у доњем гениталном тракту најчешће протиче асимптоматски (70-90%), и сходно томе недиагностикована, да би се у великом проценту оболелих (20%-40%) инфекција проширила на горњи генитални тракт. У горњем гениталном тракту, услед способности хламидија да опстану, упркос активацији имунолошких механизма одбране, може доћи до перзистентне инфекције јајовода, евентуалног формирања ожиљног ткива и оклузије јајовода, са тешким компликацијама у виду тубарног инфертилитета или ектопичне трудноће. Процењено је да је готово 50% инфертилитета код жена узроковано хламидијалним инфекцијама.

Фактори који условљавају да код већине жена инфекција спонтано пролази, док код других постаје перзистентна и доводи до компликација још увек нису разјашњени, услед чега постоји неколико хипотеза које покушавају да објасне патогенезу перзистентне хламидијалне инфекције.

Целуларна хипотеза подразумева да проинфламаторни цитокини (TNF, IL-1, IFN- γ) које продукују, како имунске ћелије које учествују у одбрани од инфекције, тако и ћелије инфициране хламидијама, директно доводе до оштећења инфицирног ткива јајовода. Наиме, имунски и инфламаторни одговор, који се развијају услед присуства хламидија, доводе до инхибиције репликације ретикуларних тела, при чему настају велике, аберантне, нерепликативне, перзистентне интрацелуларне форме хламидија, које су резистентне на механизме имунске одбране. Услед инхибиције репликације и смањења броја елементарних тела испод критичне тачке, имунски и инфламаторни одговор се гасе, а перзистентна форма поново прелази у репликативни. Перзистентно присуство хламидија у епителу гениталног тракта и наизменични циклуси репликације и активације имунског одговора доводе до формирања ожиљног ткива и оклузије јајовода.

Имунобиолошка хипотеза указује да на исход инфекције у највећој мери утиче тип имунског одговора који се развија у контакту са хламидијама. Поларизација у правцу Th1 имунског одговора, уз активацију CD4⁺ лимфоцита који продукују IFN- γ и активација макрофага доводе до елиминације узрочника и престанка инфекције. Насупрот томе, активација Т регулаторних ћелија које продукују IL-10, у раној фази инфекције може довести до инхибиције протективног имунског одговора и развоја перзистентне инфекције. Који ће подтип Т лимфоцита доминирати у имунском одговору на стране антигене, зависи од бројних фактора. Са једне стране, врста и карактеристике антигена хламидија на које имунски систем одговара, као и механизми којима хламидије избегавају имунски одговор са друге стране су најзначајнији фактори који одређују тип имунског одговора и исход инфекције.

Алтернативна могућност која обједињује предходне хипотезе је да способност хламидија да опстану интрацелуларно упркос активацији имунског одговора, и настанак аберантних форми које доводе до перзистентне инфекције условљавају развој пролонгираног инфламаторног одговора који доводи до колатералног оштећења ткива, што следствено индукује регулаторне механизме самоконтроле (Treg, IL-10/Th1) који спречавају настанак имунопатолошког оштећења ткива, али и омогућавају даљу перзистенцију хламидија.

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

Циљ: Основни циљ планираног истраживања је да се утврде имуно-патогенетски механизми који се налазе у основи перзистентне хламидијалне инфекције тј., да се испитају функционалне и фенотипске карактеристике мононуклеарних леукоцита испитаница са перзистентном хламидијалном инфекцијом, као и евентуална повезаност ових параметара са нивоом перзистенције хламидијалне инфекције.

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

1. Утврдити присуство *C. trachomatis* у цервикалном брису испитаница.
2. Одредити титар антитела специфичних за MOMP, cHSP-60 и cHSP10 у серуму испитаница.
3. Испитати профил секретованих цитокина (Th1/Th2/Th9/Th17/Th22) у периферној крви испитаница.
4. Утврдити присуство и фенотип Т-лимфоцита (CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- γ /IL-10 Th1), као и присуство и фенотип дендритичних ћелија (pDC, mDC) у периферној крви испитаница.
5. Утврдити присуство и фенотип Т-лимфоцита (CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- γ /IL-10 Th1), као и присуство и фенотип дендритичних ћелија (pDC, mDC) у мукози цервикса испитаница

Значај: Процењује се да је 50% инфертилитета код жена узроковано тубарним фактором услед перзистентне хламидијалне инфекције, међутим, механизми који доводе до перзистенције хламидија у гениталном тракту жена су недовољно познати. Неспорна је само једна чињеница, а то је да је тубарна оклузија сигурно последица пролонгиране инфламације која се јавља као одговор на перзистентну инфекцију. Обзиром да присуство, фенотип, као и функција Т- регулаторних лимфоцита и дендритских ћелија у инфекцијама изазваним *C. trachomatis* до сада нису истраживани, утврђивање евентуалне повезаности између, функционалних и фенотипских карактеристика мононуклеарних леукоцита са нивоом тубарног оштећења може пружити не само значајан увид у имунопатогенетске механизме који леже у основи перзистентне хламидијалне инфекције, већ могу представљати и основу евентуалне терапије која би била усмерена не само на ерадикацију узрочника већ и на превенцију настанка имунопатолошког оштећења ткива и тешких компликација.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Док су механизми перзистенције и спречавања настанка проинфламаторног оштећења, као и улоге IL-10, Т регулаторних и Th1 ефекторних лимфоцита који продукују IL-10 у неким експерименталним моделима паразитарних интрацелуларних инфекција, у великој мери разјашњени, значај ових механизма у настанку перзистенције и имунопатолошког оштећења код инфекција хламидијама је готово у потпуности непознат.

Нема много радова који су се бавили овом комплексном проблематиком (претраживањем дигиталне базе података Националне медицинске библиотеке САД - PubMed, коришћењем две кључне речи *Chlamydia trachomatis* и Treg, добија се свега 6 радова), при чему се само два од наведених односе на инфекције гениталног тракта и то у анималним моделима. Претрагом литературе нисмо добили ни један рад који се односи на имунопатогенетске механизме и улогу IL-10, Т регулаторних и Th1 ефекторних лимфоцита у настанку перзистенције и имунопатолошког оштећења код жена које имају гениталну инфекцију изазвану *C. trachomatis*.

2.7 Методе истраживања

Врста студије

Истраживање је дизајнирано по типу студије сличај-контрола (case-control study)

Пацијенти

У истраживању ће узорак случајева чинити испитанице са перзистентном хламидијалном инфекцијом, узраста од 20 до 40 година, које имају потврђен тубарни фактор инфертилитета, тј. жене код којих није дошло до концепције у току једне године регуларних односа без контрацепције и код којих је тубарни фактор инфертилитета потврђен хистеросалпингографијом или лапароскопским налазом.

Узорак контролних испитаница чиниће фертилне жене.

Општи протокол

Свим испитаницама, биће узета четири **ендоцервикална бриса**. Први ендцервикални брис, за VIDAS квалитативни тест, ради откривања присуства антигена хламидије. Други ендцервикални брис, за имунофлуоресцентни (IF) квалитативни тест ради откривања присуства антигена *C. trachomatis*. Трећи ендцервикални брис, за PCR, ради откривања специфичних секвенци генома *C. trachomatis* и четврти ендцервикални брис који се узима помоћу ендцервикалне четкице, ради одређивања локалних целуларних маркера хламидијалне инфекције. Ендцервикални узорци за одређивање локалних целуларних маркера хламидијалне инфекције добиће се помоћи ендцервикалних четкица (cytobrush). Након узимања бриса, ендцервикалну четкицу пренети у епрувету са медијумом (RPMI) и снажно завртети неколико пута како би се цервикалне ћелије ресуспендовале. Четкицу бацити а суспензију цервикалних ћелија оставити у леденом купатили на +4°C до замрзавања на -70°C.

Свим испитаницама ће се узимати и **узорци крви** из периферне вене, у запремини од 10 mL, према важећим стандардима за биохемијске анализе, ради одређивања серумских и периферних целуларних маркера хламидијалне инфекције. Након венепункције крв центрифугирати 10мин на 2000rpm. Бели телих пренети на лимфопреп и центрифугирати 22мин на 2700rpm. Плазму поделити на два дела и заледити на -20°C. Издвојити мононуклеарне леукоците и три пута их опрати у RPMI.

Издвојене мононуклеарне леукоците и цервикалне ћелије ($2-4 \times 10^6/\text{ml}$) заледити на -70°C до извођења есеја.

Присуство C. trachomatis ће се одређивати комерцијалним VIDAS, DIF и PCR тестовима, према упутству произвођача.

Серумски маркери одређиваће се комерцијалним ELISA тестовима, према упутству произвођача. Серумске концентрације цитокина ће се одређивати методом проточне цитометрије употребом FlowCytomix Multiplex кита (Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex FlowCytomix Multiplex, eBioscience) којим се истовремено, из једног узорка (25µl) одређује 13 хуманих цитокина

Целуларни маркери одређиваће се присуством и фенотипизацијом Т-лимфоцита ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- γ /IL-10 Th1) као и присуством и фенотипизацијом дендритичних ћелија (pDC, mDC) помоћу методе проточне цитометрије, а коришћењем FC500 Benchtop Cytometer, Beckman Coulter и анти-хуманих антитела.

Снага студије и величина узорка. У доступној литератури нема студија дизајна директно упоредивог са предложеним истраживањем. Стога је величина узорка израчуната на основу података о вредности концентрације цитокина (IFN-gamma и IL-10), броја pDC и учесталости перзистентне хламидијалне инфекције код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је прорачунат узимајући алфа грешку од 0.05, снагу студије од 0.95 и однос 1:1 за број испитаника у експерименталној и контролној групи, коришћењем т-теста (два независна узорка) и статистичког програма G*Power3. На основу резултата концентрација IFN-gamma (347.96 ± 52.67 vs 115.91 ± 65.83) и IL-10 (27.94 ± 17.5 vs 7.57 ± 3.16) код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета у односу на контролу, студијски узорак је прорачунат на по 3 испитанице у свакој групи за IFN-gamma и 20 испитаница у свакој групи за IL-10. На основу публикованих података о броју pDC (15834 ± 9005 vs 6300 ± 4076) код пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета у односу на контролу, студијски узорак је прорачунат на по 12 испитаница у свакој групи. Обзиром да се према литературним подацима, перзистентна хламидијална инфекција јавља у приближно 50% пацијенткиња са тубарним фактором инфертилитета, број испитаника према групама је утврђен коришћењем корективног фактора 2, а на основу претпоставке која захтева највећи узорак (IL-10:20) тако да он износи 40 (укупан узорак од 80). 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 $\geq 95\%$. После укључивања

половине предвиђених испитаника буће учињена прелиминарна статистичка анализа на основу чијих резултата се укупни студијски узорак може смањити или повећати.

Статистичка обрада података. Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. У зависности од квалитативних и квантитативних карактеристика добијених података, биће спроведене одговарајуће статистичке анализе. Код нумеричких варијабли, такве методе укључују тестирање хипотезе за два независна узорка (Студентов т-тест или Вилкоксон-Ман-Витни тест). Код категоријалних варијабли (нпр. присуство или одсуство специфичних антитела) ће се користити хи-квадрат тест или Фишеров тест. Веза између испитиваних варијабли ће се анализирати коришћењем Пирсонове корелације (нумеричке континуиране варијабле) или Спирманове корелације ранга. Методом бинарне логистичке регресије ће бити утврђивана значајност утицаја варијабли на дихотомне исходе, како самостално (униваријабилна) тако и удружено (мултиваријабилна анализа). За статистичку анализу ће бити коришћен одговарајући статистички софтвер, а вредности вероватноћа статистичке значајности за све статистичке методе ће бити утврђене на $p < 0,05$ (5%).

2.8. Очекивани резултати

Анализирајући податке из литературе који се односе на експерименталне моделе интрацелуларних паразитарних инфекција и клиничких студија у којима је испитиван имунски одговор на *C. trachomatis*, можемо претпоставити да код пацијенткиња са потврђеном перзистентном инфекцијом доминира пролонгирани инфламаторни одговор: висок ниво серумског IFN- γ и висок титар анти-сHSP60 антитела, уз следствену индукцију регулаторних механизма само-контроле: висок ниво серумског IL-10 и TGF- β , појачано присуство Т регулаторних (CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 Treg) и/или IFN- γ /IL-10 Th1 и плазмацитоидних дендритских ћелија (pDC).

2.9 Оквирни садржај дисертације

Chlamydia trachomatis је најчешћи сексуално преносиви бактеријски узрочник. Код жена, инфекција *C. trachomatis* у 20% до 40% случајева, може довести до перзистентне инфекције јајовода, формирања ожиљног ткива у њима и последичног инфертилитета. Док је улога IL-10, Т регулаторних и Th1 ефекторних лимфоцита који продукују IL-10 у неким експерименталним моделима, у великој мери разјашњена, значај ових механизма у настанку перзистенције и имунопатолошког оштећења код инфекције хламидијом је готово у потпуности непознат.

У овој студији, у свим узорцима цервикалних брисева, одређиваће се присуство *C. trachomatis* комерцијалним VIDAS, DIF и PCR тестовима. У серуму испитаница одређиваће се титар специфичних антитела на: MOMP, сHSP-60 и сHSP10 комерцијалним ELISA тестовима као и серумске концентрације цитокина методом проточне цитометрије употребом FlowCytomix Multiplex кита. Присуство и фенотипизација Т-лимфоцита (CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- γ /IL-10 Th1) као и присуство и фенотип дендритичних ћелија (pDC, mDC) у цервиксу и периферној крви

испитаница, одређиваће се методом проточне цитометрије, коришћењем FC500 Benchtop Cytometer, Beckman Coulter и анти-хуманих антитела.

Анализирајући податке из литературе који се односе на експерименталне моделе интрацелуларних паразитарних инфекција и клиничких студија у којима је испитиван имунски одговор на *S. trachomatis*, можемо претпоставити да код пацијенткиња са потврђеном инфекцијом и перзистентном инфекцијом доминира пролонгирани инфламаторни одговор: висок ниво серумског IFN- γ и висок титар анти-cHSP60 антитела, уз следствену индукцију регулаторних механизма самоконтроле: висок ниво серумског IL-10 и TGF- β , појачано присуство Т регулаторних (CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 Treg) и/или IFN- γ /IL-10 Th1 и плазмацитоидних дендритских ћелија (pDC).

Истраживање би требало да нам омогући боље разумевање имунопатогенетских механизма перзистентне хламидијалне инфекције, али и основу евентуалне терапије усмерене на превенцију настанка имунопатолошког оштећења ткива и компликација хламидијалне инфекције.

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 Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. Доц. др Александра Димитријевић члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Александра Д. Арсовић, испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука 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. Александре Д. Арсовић показати да постоје значајни статистички показатељи о улози Treg и дендритичних ћелија у перзистентној хламидијалној инфекције.
4. Комисија предлаже Већу ментора Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Александре Д. Арсовић, под називом: “Имунопатогенетски механизми перзистенције хламидија у гениталном тракту жена ” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Бранислава Коцић редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

2. Проф. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

3. Доц. др Александра Димитријевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.

У Крагујевцу, 14.11.2012. године.