

Број:	19.07.2019
Датум:	19.07.2019
Место:	Крагујевац
Својеручно:	05: 2771-1

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-03-483/31 од 14.06.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Савић Боривоја под називом:

**„Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације *IL28B* гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса“**

Чланови комисије су:

- 1. Проф. др Сунчица Срећковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, председник
- 2. Доц. др Татјана Шаренац-Вуловић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, члан
- 3. Проф. др Јевросима Стевановић**, ванредни професор Факултета ветеринарских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија-генетика, члан

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

**2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

**2.1. Кратка биографија кандидата**

Др Савић Боривоје је рођен 06.05.1980. године у Кикинди где је завршио основну школу и гимназију. Дипломирао је и специјализирао на Факултету за примењену екологију Универзитета Сингидунум у Београду и Биолошком факултету Универзитета у Београду 2010. године. Стекао је звање дипломирани мастер аналитичар заштите животне средине – еколог и дипломирани биолог специјалиста – генетичар. Докторирао је на факултету за примењену екологију Универзитета Сингидунум 2014. године и стекао звање

доктора наука – заштита животне средине екологија, ужа област – генетика. Тема докторске дисертације: „Значај генетичке карактеризације и филогенетске анализе цирковируса типа 2 (PCV2) у екосистему Србије“. Рад из теме доктората објављен је у часопису - M22, ARCHIVES OF VIROLOGY, (2012) VOL 157 BR 1, STR 21- 28. Ради у Клиници за очне болести Клиничког центра Србије у одељењу за трансплантацију рожњаче (очна банка) као специјалиста биолог - генетичар. Члан је Националног трансплантационог тима Клиничког центра Србије. Извршио је преко 50 експлантација рожњаче и учествовао у преко 50 успешних трансплантација рожњаче. Први је у Србији, у очној банци КЦС у августу 2017. године „банкирао“ ткиво рожњаче. У оквиру додатног и стручног образовања поседује сертификате: 1) Очна банка, Клиника за очне болести у Венецији, Италија - процена квалитета рожњаче; 2) КЦ „Ребро“, Хрватска - процена квалитета рожњаче, експлантација рожњаче и генетика рожњаче; 3) КЦ Србије, Клиника за очне болести - експлантација рожњаче; 4) Научни институт за ветеринарство Србије - основи молекуларне дијагностике.

## **2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације**

**Наслов:** „Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације *IL28B* гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса“

**Предмет:** Испитивање утицаја фолне киселине, витамина В12 и генетичких варијација *IL28B* гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса.

**Хипотезе:**

1. Варијанте *IL28B* дају већу или мању предиспозицију за рекурентни херпетични кератитис.
2. Латентна инфекција HSV-1 и активација самог вируса је условљена епигенетски и повезана са недостатком витамина В12 и фолне киселине код испитника са рекурентним херпетичним кератитисом.

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Савић Боривоје, објавио је рад у целости у часопису категорије M23, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. Savić B, Stanojlović S, Stojković M, Mišić M, Savić B, Draganić V. Potential role of folic acid and vitamin B12 in herpes simplex virus keratitis reactivation. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP181001037S **M23**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Вирус *Herpes simplex* тип 1 (HSV-1) је свеprisутни људски патоген. Готово 90% одрасле популације даје позитивне резултате на присуство анти HSV-1 антитела. Слепило код људи може бити узроковано инфекцијом ока са HSV-1, због инфилтрирања ефекторских Th1 ћелија и нелимфоидних инфламацијских ћелија које могу резултирати хроничним оштећењем рожњаче. Интерлеукин 28B (интерферон- $\lambda$ 3), припада породици интерферона типа III у коју спадају: IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 и IFN- $\lambda$ 3 који се још називају и IL29, IL28A и IL28B (4,5). IFN- $\lambda$  показује бројне биолошке карактеристике које су сличне интерферонима  $\alpha$  и  $\beta$ , укључујући антивирусну, антипролиферативну активност и антитуморску активност *in vivo*. Интерферони типа I и II могу утицати на експресију рекурентног херпетичног кератитиса, али исто тако и IFN- $\lambda$  показује да је његова смањена експресија у корелацији са рекурентним HSV-1 обољењима. Поред тога, HSV-1 успоставља латентну инфекцију у сензорним неуронима, а латентни вирусни геном има транскрипцијски активан LAT (енгл. Latency-Associated Transcript) регион који бележи различите облике распоређивања хистона што указује на епигенетску природу вируса. Витамин B12 и фолна киселина су укључени у процес метилације молекула ДНК. Метилација молекула ДНК је повезана са уносом фолата и концентрацијом фолне киселине у телу.

### 2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије се огледа у првом генотипирању испитаника са рекурентним херпетичним кератитисом за *IL28B* и могућем утицају генотипа на настанак рекурентног херпетичног кератитиса.

Значај студије се огледа и у откривању могуће улоге концентрација витамина В12 и фолне киселине у крви за реактивацију HSV-1 инфекције код испитаника са рекурентним херпетичним кератитисом. Витамин В12 и фолна киселина се први пут доводе у везу са рекурентним херпетичним кератитисом као доказани модулатори ДНК молекула.

### **Циљеви**

1. **Циљ** студије је истражити могућу повезаност између генотипа за *IL28B* домаћина и предиспозиције за рекурентни херпетични кератитис.
2. **Циљ** истраживања је и откривање могуће везе концентрација витамина В12 и фолне киселине и рекурентног херпетичног кератитиса.

### **2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

Досадашња истраживања су показала да вирусне инфекције које могу индуковати експресију IFN- $\alpha/\beta$  такође стимулишу експресију IFN- $\lambda$ . Истраживања повезана са испитивањем спонтаног клиренса инфекције вирусом хепатитиса С (HCV), директно повезују утицај различитих фактора домаћина. Полиморфизми у региону гена *IL28B* су повезани са спонтаним клиренсом HCV, имплицирајући генски производ, интерферон (IFN)- $\lambda 3$ , у имунском одговору на HCV. Поред тога, полиморфизми у региону гена *IL28B* су повезани са HSV-1 инфекцијом лабијалног подручја. Анализа могуће корелације у варијацији *IL28B* домаћина и предиспозиције за рецидив херпетичног кератитиса је основа за наше истраживање. Занимљива је процена утицаја концентрације фолата и витамина В12 на ризик од рака грлића материце. Уз то, недавно је примећено да је повратни афтозни стоматитис, укључујући и онај херпесне етиологије, такође повезан са недостатком витамина В12. Све до сада наведено у литератури имплицира актуелност теме и сам допринос научној заједници.

### **2.7. Методе истраживања**

#### **2.7.1. Врста студије**

Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

Ова студија ће се спроводити у складу са прописима одбора за ревизију институција, уредбом о информисаном пристанку и поштовању начела Хелсиншке декларације. Етички комитет Клиничког центра Србије, Београд, је одобрио студију дана 21.03.2019. под редним бројем 57/14. Испитивање ће обухватити 90 испитаника старијих од 18 година, без обзира на пол. Испитаници ће бити клинички праћени најмање годину дана у Клиници за очне болести Клиничког центра Србије, Београд како би се верификовала појава рекурентног херпетичног кератитиса. Генотипизације за *IL28B* (rs12979860snp), урадиће се у Научном институту за ветеринарство Србије. Узорци крви за витамин В12 и фолну киселину анализираће се у истој лабораторији, која је сертификована системом квалитета Total Quality Management (TQM).

### **2.7.2. Популација која се истражује**

Сваки испитаник са или без историје рецидива херпетичног кератитиса ће добровољно попунити упитник у којем ће потврдити да ли је имао поновљене инфекције које се манифестују као лабијални херпес, у циљу хомогенизације испитиване групе. Сви испитаници ће бити тестирани на IgG анти HSV-1. Клиничким прегледом рецидиви ће бити класификовани као епителни кератитис, стромални кератитис, ендотелитис, иридоциклитис или као комбинација ових стања. Ниједан од укључених испитаника неће узимати било који облик суплементације комплексом витамина В најмање 12 месеци пре узимања узорка крви. Критеријуми искључивања су следећи: историја очних коморбидитета, претходна операција ока, неки облик анемије или системске и неуролошке болести.

### **2.7.3. Узорковање**

Испитивање ће обухватити 90 испитаника старијих од 18 година, без обзира на пол. Узорци крви ће бити сакупљени од испитаника са или без историје рецидива херпетичног кератитиса. Сви испитаници ће бити тестирани на IgG анти HSV-1 како би се изабрали позитивни болесници. Ове испитанике ћемо генотипизирати за *IL28B* (rs12979860snp). Испитаницима укљученим у студију са рецидивом херпетичног кератитиса измерићемо концентрације витамина В12 и фолне киселине у акутној фази болести. Изабраним испитаницима за одређивање варијације *IL28B* узимаће се 5ml периферне венске крви.

За изоловање укупне ДНК користиће се комерцијални кит по упутству произвођача. У геному ће се испитивати полиморфизам појединачног нуклеотида (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) rs12979860 у близини *IL28B* на хромозому 19. Концентрација витамина В12 ће се мерити на “Roche Cobas 6000” анализатору, (ECLIA Method), а концентрација фолата на “Roche Cobas E411” анализатору, (ECLIA Method).

#### **2.7.4. Варијабле**

##### **Независне варијабле**

Генотип праћених испитаника са или без рекуретног херпетичног кератитиса за *IL28B* (rs12979860). Концентрација витамина В12 и фолне киселине у крви испитаника са рекуретним херпетичним кератитисом.

##### **Зависне варијабле**

Варијације генотипа за *IL28B* код испитаника са рекуретним херпетичним кератитисом. Број рецидива херпетичног кератитиса у односу на концентрације витамина В12 и фолне киселине у крви код испитаника са рекуретним херпетичним кератитисом.

#### **2.7.5. Снага студије и величина узорка**

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима наших публикованих истраживања и истраживања других аутора који су проучавали утицај испитиваног генотипа код испитаника са лабијалним херпесом, као и ефекат концентрација витамина В12 и фолне киселине у крви код испитаника са рекуретним херпетичним кератитисом. Коришћењем одговарајућег рачунарског програма и  $\chi^2$  теста уз вероватноћу алфа грешке од 0,05, снагу студије од 0,08, добијен је минималан број испитаника од 40 испитаника. Укупна величина узорка биће 90 испитаника.

#### **2.7.6. Статистичка обрада података**

Статистичка значајност разлике била би постављена на нивоу од  $p < 0.05$ . Статистичка обрада података биће обављена у статистичком пакету SPSS 20.0. За опис параметара од значаја, биће коришћене методе дескриптивне статистике, графичко и табеларно приказивање. У зависности од расподеле, за анализу података користиће се одговарајући

параметријски или непараметријски тестови: Студентов t-тест или Mann Whitney тест. Зависност варијабли, тип генотипа и појава рекурентног херпетичког кератитиса анализираће се применом  $\chi^2$  теста, уз праг значајности од 0,05. Илустрацију асоцијације између генотипова и ризика за настанак рекурентног херпетичког кератитиса представићемо израчунавањем величине утицаја између те две варијабле. Регресионом анализом на основу дијаграма растурања и анализом варијансе (ANOVA), пратићемо зависност концентрација витамина B12 и фолне киселине код испитаника у акутној фази херпетичног кератитиса.

## 2.8. Очекивани резултати и значај студије

Очекујемо да резултати покажу који генотип се приказује чешће за *IL28B* код испитаника са историјом рецидива херпетичног кератитиса.

Закључак о могућој улози концентрација витамина B12 и фолне киселине у крви узимајући у обзир епигенетску природу реактивације HSV-1.

## 2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Интерферони III типа (*IL28B*) имају веома значајну антивирусну и антиинфламацијску активност, што је од посебног значаја код рекурентног херпетичног кератитиса. Епигенетска природа реактивације HSV-1 вируса између осталог може зависити и од присуства и концентрација доказаних епигенетских модулатора као што су витамин B12 и фолна киселина укључених у процес метилације молекула ДНК. Циљ студије је истражити могућу повезаност између генотипа за *IL28B* домаћина и предиспозиције за рекурентни херпетични кератитис. Циљ истраживања је и откривање могуће везе концентрација витамина B12 и фолне киселине и рекурентног херпетичног кератитиса. Резултати треба да дају одговор која варијација је најчешћа за *IL28B* код болесника са историјом рецидива херпетичног кератитиса и да покажу могући утицај концентрација витамина B12 и фолне киселине у реактивацији рекурентног херпетичног кератитиса. Из будућих резултата очекује се закључак да ли постоји асоцијација између генских варијација *IL28B* и појаве рекурентног херпетичног кератитиса, као и каква је улога витамина B12 и фолне киселине у превенцији реактивације херпетичног кератитиса.

### 3. Предлог ментора

За коменторе ове докторске дисертације се предлаже проф. др Нела Ђоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хигијена са медицинском екологијом, и проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хумана генетика.

Проф. др Нела Ђоновић и проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић поседују стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњавају услове за менторе докторске дисертације у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

#### 3.1. Компетентност ментора

Радови проф. др Неле Ђоновић који су у вези са темом докторске дисертације

1. Stajic D, Popovic B, Spajak M, Ribaric S, **Djonovic N**. Is there an association between nutritional status and intellectual capabilities of adolescents? *Progress in Nutrition*. 2018;20(2):279-289.
2. Protrka Z, Dimitrijevic A, Jovic N, Kastratovic T, Djuric J, Nedovic J, Zivanovic S, Vujic A, Drakulic SM, **Djonovic N**, Arsenijevic P. Expression analysis of the Beclin-1 in premalignant and malignant tissues of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2018; 39(6):915-920.
3. Đokić B, **Đonović N**, Tadić B, Nikolić D. Factors and estimation of risk for cardiovascular diseases among patients in primary health care in central Serbia. *Cent Eur J Public Health*. 2015; 23 (3): 195-199
4. Jeremić D, Kocić S, Vulović M, Sazdanović M, Sazdanović P, Jovanović B, Jovanović J, Milanović Z, **Đonović N**, Simović A, Parezanović-Ilić K, Maliković A, Toševski J, Živanović-Mačužić I. Anthropometric study of the facial index in population of central Serbia. *Arch Biol Sci*. 2013; 65(3):1163-1168
5. Petković-Košćal M, Damjanov V, **Djonović N**. Influence of moderate physical activity on the levels of plasma lipoproteins in subjects with impaired glucose tolerance. *Srp Arh Celok Lek*. 2012; 140(1-2):51-57.



Радови проф. др Оливере Милошевић-Ђорђевић

1. Mihaljević O, Živančević-Simonović S, **Milošević-Djordjević O**, Djurdjević P, Jovanović D, Todorović Z, Grujičić D, Radović-Jakovljević M, Tubić J, Marković A, Paunović M, Stanojević-Pirković M, Marković S. Apoptosis and genome instability in children with autoimmune diseases. *Mutagenesis*. 2018;33(5-6):351-357.
2. **Milošević-Djordjević O**, Grujičić D, Radović Jakovljević M, Marinković D, Dimitrijević S, Mihaljević O, Mijatović-Teodorović Lj, Živančević –Simonović S. Influence of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes on differentiated thyroid cancer risk and baseline and radioiodine induced cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of patients. *Genetika (Beograd)*. 2017;49(2):599-611.
3. Grujičić D, Radović M, Arsenijević, **Milošević-Djordjević O**. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes in vitro and in vivo. *European Journal of Medical Genetics*. 2016;59:624-633.
4. Stošić I, Grujičić D, Arsenijević S, Brkić M, **Milošević-Djordjević O**. Glutathione S transverase T1 and M1 polymorphisms and risk for uterine cervical lesions in women from central Serbia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(7):3201-5.
5. Vrndić O, **Milošević-Djordjević O**, Mijatović Teodorović Lj, Jeremić M, Stošić I, Grujičić D, Živančević Simonović S. Correlation between micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and retention of 131-I in thyroid cancer patients. *Tohoku J Exp Med*. 2013;229(2):115-24.
6. Arsenijević S, Ljujić B, Stošić I, Grujičić D, Marinković D and **Milošević- Djordjević O**. Polymorphisms of the *GSTT1* and *GSTM1* genes in women of central Serbia-absence of association with uterine myoma. *Arch Biol Sci*. 2013;65(2):415-420.

#### 4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Превентивна медицина

## 5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Сунчица Срећковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, председник
2. Доц. др Татјана Шаренац-Вуловић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, члан
3. Проф. др Јевросима Стевановић, ванредни професор Факултета ветеринарских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија-генетика, члан

### ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат Савић Боривоје испуњава све услове прописане законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Комисија је утврдила да се ради о оригиналном научном делу које има за циљ да испита улогу фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације *IL28B* гена у настанку рекуретног херпетичног кератитиса. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен, методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Савић Боривоја: „Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације *IL28B* гена у настанку рекуретног херпетичног кератитиса“

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

**Проф. др Сунчица Срећковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, председник



**Доц. др Татјана Шаренац-Вуловић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета  
у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, члан



**Проф. др Јевросима Стевановић**, ванредни професор Факултета ветеринарских наука  
Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија-генетика, члан

