

## **Nastavno-naučnom vijeću Medicinskog fakulteta u Foči Univerzitet u Istočnom Sarajevu**

**Predmet:** Izvještaj komisije o podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske disertacije

Odlukom Nastavno-naučnog vijeća Medicinskog fakulteta u Foči Univerzitet u Istočnom Sarajevu od 14.06.2019. god. usvojen je prijedlog projekta kandidata dr Ganimete Bakalović za izradu doktorske disertacije pod nazivom **ODNOS POREMEĆAJA FUNKCIJE GRANULOCITA PERIFERNE KRVI I KLINIČKE SLIKE DJECE OBOLJELE OD CISTIČNE FIBROZE** i imenovana je Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata u sastavu:

1. Prof.dr Dejan Bokonjić, uža naučna oblast Pedijatrija vanr. prof. Medicinski fakultet u Foči, mentor i član Komisije,
2. Prof.dr Predrag Minić, uža naučna oblast Pedijatrija, red. prof. Medicinski fakultet u Beogradu, komentor i član Komisije,
3. Acc.prof.dr Miodrag Čolić, uža naučna oblast Imunologija, red. prof. Medicinski fakultet u Foči, član Komisije.

Na osnovu uvida u predloženu dokumentaciju Komisija podnosi Nastavno-naučnom vijeću Medicinskog fakulteta u Foči sljedeći

### **IZVJEŠTAJ**

#### **Osnovni biografski podaci o kandidatu i njegovom stručnom radu**

Dr Ganimeta Bakalović je rođena 1975. god. u Priboju, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet je završila u Novom Sadu 2001 god. Od 2002. do 2004. bila je uposlenik Doma zdravlja u Goraždu, BiH. Od 2002. do 2012. radila je u Kantonalnoj bolnici u Goraždu. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je u oktobru 2009. godine. U periodu od 2012. do 2013. godine radila je u Domu zdravlja u Sarajevu, a od 2013. godine zaposlena je na Pedijatrijskoj klinici u Sarajevu, odjel pulmologija, gdje i danas radi. Predmet najvećeg interesovanja joj je, u toku specijalizacije, bila oblast iz dječije pulmologije. U UKC Ljubljana stekla je znanje i vještinu za izvođenje fleksibilne fiberbronhoskopije kod djece. Učestvovala je na evropskim i svjetskim kongresima iz pedijatrije. Autor i koautor je u više radova objavljenih u časopisima i zbornicima radova u zemlji i inostranstvu. Udata je, majka troje djece.

d

## Predmet i značaj istraživanja

Cistična fibroza (CF) je najčešća genetska bolest ljudi bijele rase i rezultat je mutacije u genu koji kodira transmembranski regulator provodljivosti za jone hlora (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) (1). Mutacija u CFTR genu dovodi do manifestacije bolesti, koja je posljedica deficijencije, disfunkcije ili potpunog odsustva CFTR proteina, što onemogućava izlazak jona hlora iz ćelija u lumen izvodnih kanala egzokrinih žlijezda. CFTR reguliše i funkciju epitelnih natrijumskih kanala (ENaC) i zbog njegove poremećene funkcije dolazi do prekomjerne apsorpcije jona Na u ćelije i povlačenja vode iz lumena kanala. Zbog toga u kanalima ostaje gust, viskoznan sekret, koji dovodi do opstrukcije lumena izvodnih kanala.

Opisano je šest klasa mutacija u CFTR genu. Najčešća mutacija je delecija fenilalanina na poziciji 508 (DF508) u sekvenci od 1480 aminokiselina koliko ima CFTR i prisutna je kod preko 80% oboljelih (2). Bolest pluća, koju karakteriše hronična neutrofilna upala, progresivna opstrukcija protoka vazduha i bakterijske infekcije disajnih puteva, glavni su uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa CF (3).

Rana bakterijska infekcija uglavnom je uzrokovana *S. aureus* i *Haemophilus influenzae*. Ova slika se razvija i mijenja tokom vremena, tako da više od 80% CF tinejdžera imaju hroničnu infekciju uzrokovanu sa *Pseudomonas aeruginosa* (4). Kolonizacije i/ili infekcija drugim bakterijama kao što su *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* i *Burkholderia cepacia*, povećavaju se sa starošću bolesnika, ali su i generalno rjeđe prisutne (5).

Odnos između abnormalne funkcije CFTR i razvoja upale pluća nije u potpunosti razjašnjen. Da li je masivna upalna reakcija u CF sekundarna ili je primarna zbog CFTR defekta, intenzivno se proučava decenijama (6). Nedavno objavljena studija na eksperimentalnim životinjama sugerise da upala može nastati i bez infekcije (7). Takođe, iznosi se koncept da sam CFTR može biti imunomodulator i da, stimulišući CFTR funkciju kod pacijenata sa CF-om, može stimulisati antimikrobnu funkciju neutrofila i makrofaga (8). U prilog tome govore i podaci o prisustvu IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u BAL-u djece sa CF i da koreliraju sa neutrofilnom inflamacijom u odsustvu detektabilne respiratorne infekcije. Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu IL-1R-MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) signalnog puta u patogenezi početne CF bolesti (9).

Među upalnim ćelijama, neutrofilni su prisutni u najvećem broju. I dok s jedne strane predstavljaju prvu liniju odbrane, sa druge strane ove imune ćelije kratkog životnog vijeka ireverzibilno oštećuju plućni parenhim (10). Korelacija između neutrofila i ireverzibilnog remodeliranja plućnog tkiva (bronhiektazije) ukazuje na štetnu ulogu neutrofila, ali bez funkcionalnih neutrofila nema efikasne odbrane od bakterija i gljivica (11).

U disajnim putevima kod CF, iz neutrofila oslobađaju se velike količine intracelularnog sadržaja uključujući hemoatraktante (koji podstiču dalji dolazak neutrofila), reaktivne radikale kiseonika i proteaze odnosno elastaze koji oštećuju arhitekturu disajnih puteva. Neutrofilni onda podliježu apoptozi, nekrozi odnosno netozi. Inflamacija se stišava produkcijom antiinflamatornih citokina, kao što je IL-10, koji pospješuju apoptozu imunih ćelija.

Gubitak ili blokada aktivnog CFTR-a može biti direktno odgovorna za defektni klirens *P.aeruginosa* od strane fagocita (30), mada mehanizmi uključeni u ove procese nisu dovoljno poznati. Nije dovoljno poznato da li nefunkcionalni CFTR dovodi do primarnih promjena u neutrofilima prije njihove migracije u plućni parenhim ili se hronična plućna inflamacija reflektuje na aktivacioni status neutrofila u periferiji. U prilog prve dileme govore skorašnji podaci o preaktivacionom statusu neutrofila u perifernoj krvi kod nekih primarnih imunodeficijencija koji primarno nisu povezane sa defektom u funkciji neutrofila. Promjene se

moгу detektovati na osnovu fenotipske multimarkerske analize i proučavanjem funkcija neutrofila kao što je oksidativni prasak, produkcija ROS-a, sekrecija citokina i anti-mikrobna aktivnost (31). Zato su ovi nalazi veliki izazov da slični poremećaji postoje i kod CF što može biti osnova za postavljanje adekvatnih hipoteza za naučnu provjeru.

## **Hipoteze**

Na osnovu dosadašnjih saznanja i nedovoljno poznatih činjenica da li je poremećaj funkcije granulocita kod pacijenata od CF primarni ili sekundarni događaj postavljene su sljedeće hipoteze:

1. U perifernoj krvi djece oboljele od CF funkcije granulocita su poremećene u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.
2. Granulociti djece sa CF ispoljavaju supresorski fenotip, produkuju veće količine slobodnih kiseoničkih radikala, više nivoe IL-8 i IL-17, niže nivoe IL-10 a imaju smanjenu fagocitnu sposobnost.
3. Navedene funkcije granulocita su u korelaciji sa epidemiološkim i kliničkim karakteristikama oboljenja.

## **Ciljevi istraživanja**

Za provjeru ovih hipoteza postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja

1. Ispitati i uporediti fenotipske karakteristike granulocita periferne krvi (nestimuliranih i stimuliranih sa forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA), opsonizovanim zimozanom (OpZy), lipopolisaharidom (LPS) u kombinaciji sa N-formilmetionil-leucil-fenilalaninom (fMLP), inaktiviranim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* ili kalcijum-jonoforom (CaI)) kod djece oboljele od CF i zdrave djece.
2. Ispitati i uporediti produkciju IL-8, IL-17 i IL-10 u kulturi granulocita periferne krvi (nestimuliranih i stimuliranih sa PMA, OpZy, LPS + fMLP, inaktiviranim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* ili CaI) djece oboljele od CF i zdrave djece
3. Ispitati i uporediti intracelularnu i ekstracelularnu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta granulocita periferne krvi (nestimuliranih i stimuliranih sa PMA, OpZy, LPS + fMLP, inaktiviranim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* ili CaI) kod djece oboljele od CF i zdrave djece
4. Ispitati i uporediti fagocitnu sposobnost granulocita periferne krvi djece oboljele od CF i zdrave djece
5. Uporediti fenotipske i funkcionalne karakteristike granulocita periferne krvi djece oboljele od CF sa vrstom mutacije, epidemiološkim i kliničkim karakteristikama oboljenja.

## **Aktuelnost i podobnost doktorske disertacije**

Predložena tema je od velikog naučnog i kliničkog značaja jer se bavi razumijevanjem molekularne osnove bolesti, prije svega uloge i funkcije neutrofilnih granulocita kod oboljelih od CF. Istraživanja u ovoj oblasti mogu pomoći da se poboljša liječenje i kvalitet života djece sa ovom, danas sve rasprostranjenijom, bolešću. Aktuelnost dodatno dobija na značaju jer se radi o

istraživanja funkcije granulocita periferne krvi, obzirom da su do sada poremećaji uglavnom detektovani u inflamatornim ćelijama bronhoaleolarnog lavata.

### **Pregled stanja u području istraživanja**

Kod CF pacijenata, neutrofili disajnog puta pokazuju poremećenu funkciju ubijanja i redukovanu apoptozu (12). Izmjerena je manja ekspresija TLR2 (Toll-like receptor 2) na neutrofilima u krvi ali veća ekspresija TLR4 u plućima, dok po nekim drugim studijama izmjerena je slična ekspresija TLR4 neutrofila u krvi i plućima, ali je ekspresija TLR5 bila veća kod neutrofila u plućima u odnosu na zdrave kontrole. U stabilnom stanju, neutrofili u krvi CF pacijenata pokazuju povećan migracijski odgovor na CXCL8/IL-8 (C-X-C motif chemokine ligand 8/interleukin-8). U stanju infekcije, CF neutrofili pokazuju redukovani *in vitro* hemotaktični odgovor na LTB4 (lipid-mediator leukotriene B4) i suboptimalnu koncentraciju CXCL8/IL-8 ali ne i na N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) i komponentu komplementa 5a (C5a). Nestimulisani i LPS (lipopolysaccharide)-stimulisani neutrofili iz krvi i pluća CF pacijenata proizvode više CXCL8/IL-8 i manje antiinflamatornog IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) u poređenju sa zdravim individuuama. Takođe, neutrofili u plućima proizvode spontano više CXCL8/IL-8 nego oni u krvi, što ukazuje da upalna mikrosredina u CF plućima doprinosi navedenim fenomenima. Nestimulisani neutrofili iz krvi CF pacijenata u poređenju sa zdravim kontrolama proizvode značajno više CXCL8/IL-8 prije i nakon antibiotske terapije i pokazuju veću ekspresiju receptora za fagocitozu i adheziju (13).

Disajni putevi kod oboljelih od CF sadrže veliki broj neutrofila i povećanu koncentraciju proupalnih medijatora, uključujući TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, IL-33, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) i HMGB-1 (14). Citokini su neophodni faktori u regulisanju imunskog odgovora tokom infekcije (15). Profil citokina sputuma CF bolesnika je detaljno istražen. Pored povećane produkcije CXCL8 / IL-8, GM-CSF i IL-6, u BAL-u i / ili sputumu bolesnika sa CF su nađeni viši nivoi CCL2 / MCP-1, CCL3 / MIP-1a, CCL4 / MIP-1p, CCL20 / MIP-3 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1p, IL-17, IL-23, G-CSF i LTB4. Niže nivoje CCL5 / RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) su u korelaciji sa defektnim CFTR-om. Iako CCL2 / MCP-1 (C-C motif chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1) je potentni aktivator monocita, a ne neutrofila, ovaj hemoatraktant djeluje sinergistički sa CXCL8 / IL-8 kako bi poboljšao neutrofilnu hemotaksiju (16). Može se načelno reći da citokinski odgovor u CF karakteriše smanjena anti-upalna aktivnost (ponajviše smanjenom sekrecijom IL-10), a povećanjem sinteze pro-upalnih faktora uz promjenu ili polarizaciju Th1 i Th2 imunološkog profila koji može imati potencijalno štetnu ulogu tokom upalnih zbivanja (17). Treba istaknuti važnu ulogu hemokina IL-8, koji indukuju TNF- $\alpha$  i IL-1 preko NF- $\kappa$ B-sistema, a jedan je od najsnažnijih hemoatraktanata za neutrofile (18). Na kraju nastaje hronična inflamacija disajnog puta kao posljedica oštećenja plućnog parenhima, dovodeći do povećanja vaskularnog permeabiliteta i posljedično tome do edema disajnog puta (19).

Jedan od najistraženijih je IL-6 za koji je pokazano i proupalno i antiupalno djelovanje. IL-6 djeluje na odgađanje apoptoze neutrofila te pojačava njihov citotoksični učinak koji se ogleda, između ostalog, u produkciji kiseonikovih radikala. On snažno djeluje na indukciju proteinâ akutne faze kao što je C-reaktivni protein (20).

IL-17 je u fokusu nedavnih istraživanja, znatno je povećan u CF plućima i podstiče upalnu signalizaciju ćelija kao odgovor na štetni podražaj (21). IL-17 je važan molekul u odbrani domaćina, ali ako je prisutan u prekomjernim količinama, posebno kada je hronična infekcija

uspostavljena, on može doprinijeti imunopatologiji. IL-17 signalni put je poremećen u CF i mogao bi biti potencijalna meta za antiinflamatornu terapiju. Nedavna istraživanja neutrofila kod ljudi i miševa s CF ilustruju ogromnu plastičnost neutrofila. Tako je u BAL-u kod CF miševa bilo prisutno šezdeset puta više neutrofila koji proizvode IL-17 nakon izlaganja *P. aeruginosa* u odnosu na kontrolne divlje sojeve miševa (22). Velike količine neutrofila koji proizvode IL-17 su takođe izolovane u perifernoj cirkulaciji i sputumu kod ljudi sa CF na početku intravenskog liječenja antibioticima zbog egzacerbacije plućne bolesti sa *P. aeruginosa*. Inverzna korelacija između procenta IL17 neutrofila i FEV1 takođe je bila statistički značajna (22). Na osnovu ovih rezultata se razmatra da bi IL-17 mogao biti dobar biomarker za CF plućnu egzacerbaciju. Ovaj citokin je neophodan za uklanjanje bakterija i rješavanje upale (23). S druge strane, tokom hronične upale, IL-17 može pojačati oštećenje pluća regrutovanjem i aktiviranjem neutrofila (23). Nadalje, IL-17 stimuliše proizvodnju proupalnih citokina (npr., TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i CXCL8 / IL-8) i čini se da je uključen u pregradnju disajnih puteva i proizvodnju profibrotskih citokina IL-6 i IL-11. Prema tome, IL-17 je glavni saradnik začaranog kruga upale disajnih puteva u CF. Kao što je istaknuto, ključna uloga neutrofila, uključujući i neutrofile kod CF je fagocitoza (24, 25).

Neutrofili posjeduju nekoliko antimikrobnih mehanizama koji doprinose ubijanju mikroba u fagolizozomu. Proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) je jedna od njih. ROS sadrže kratkotrajne, reaktivne molekule, jone i radikale koji su svi derivati molekularnog kiseonika (26). Fagocitna NADPH oksidaza, koja je prisutna u neutrofilima, proizvodi superoksidne anjone iz molekularnog kiseonika kao primarni tip ROS. Superoksid se može spontano, ili uz pomoć enzima superoksid-dismutaze, prevesti u vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (27). Formirani H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeće se mijeloperoksidazom (MPO), prisutnom u velikim količinama u primarnim granulama polimorfonukleara, kako bi se dobila visoko reaktivna hipohlorna kiselina (HOCl). Neutrofili imaju nekoliko antimikrobnih proizvoda koji djeluju antimikrobno nezavisno od ROS-a. Primarne granule sadrže protein koji povećava permeabilnost bakterija (BPI), neutrofilnu elastazu (NE), proteinazu 3, katepsine, defenzine i lizozim (28). Defenzini su antimikrobni peptidi koji se oslobađaju iz neutrofila u velikim količinama koji efikasno ubijaju *P. aeruginosa* (29). Stoga su neutrofili dobro opremljeni sa dovoljno brojnim antimikrobnim mehanizmima za borbu protiv različitih patogena.

### **Značaj istraživanja sa stanovišta aktuelnosti u odrđenoj naučnoj oblasti**

Istraživanja predviđena u ovoj doktorskoj disertaciji obrađuju veoma aktuelan problem u medicinskoj praksi a koji u svojoj osnovi ima fundamentalni značaj. Ova disertacija se temelji na dosadašnjim saznanjima o CF kao kompleksnoj imunološko-inflamatornoj bolesti kod koje dolazi do progresivnog oštećenja plućnog parenhima, što je posljedica hronične bakterijske infekcije, ali i izraženog stanja inflamacije koje postoji i prije prve manifestne bakterijske infekcije. Kod djece sa ovom bolešću je već u prvim mjesecima života pokazano da u bronhoalveolarnom lavatu postoji povećan broj neutrofilnih granulocita i povećan nivo IL-8, čak i u odsustvu porasta bakterija. Iako postoji povećan broj neutrofilnih granulocita u disajnim putevima oni nisu dovoljno efikasni. Neutrofilni mikrobicidni mehanizmi su oštećeni a oslobađanjem njihovog intacelularnog sadržaja dolazi do ireverzibilnog oštećenja plućnog parenhima. Najzad, njihova uloga kao i ostalih ćelija urođenog imuniteta u aktivaciji specifičnog imuniteta nije dovoljno poznata. Izučavanje kompleksne citokinske mreže u disajnim putevima je od ključnog značaja za

razumjevanje patoloških procesa u cističnoj fibrozi. Ovi procesi nisu dovoljno poznati, a saznanja se produbljuju na osnovu napretka u fundamentalnim saznanjima iz oblasti imunologije i ćelijske biologije. Upravo zbog navedenog, rezultati dobijeni u toku istraživanja, mogli bi da doprinesu razumijevanju poremećaja funkcije neutrofilnih granulocita kod bolesnika sa cističnom fibrozom. Posebno bi bilo interesantno i veoma značajno vidjeti uticaj različitih stimulatora funkcije granulocita na proces stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i produkciju pojedinih proupalnih i antiupalnih citokina kao i proces fagocitoze. Potrebno je potom utvrditi da li postoji korelacija dobijenih rezultata sa genetikom, kliničkom slikom, stadijumom bolesti i vrstom terapije, jer bi dobijeni podaci mogli poslužiti kao prediktori toka i prognoze bolesti kod pojedinačnih bolesnika, što će omogućiti raniju intervenciju i primjenu metoda liječenja prije nego što promjene postanu ireverzibilne. Očekujemo da ćemo upotrebom različitih stimulatora modifikovati imuni odgovor granulocita što bi moglo biti iskorišteno za nove terapijske modalitete. Zbog toga predloženo istraživanje ima izvornu originalnost, naučnu zasnovanost i naučnu opravdanost.

### **Podobnost kandidata i njegove reference**

Komisija smatra da je kandidat apsolutno pogodan da uspješno završi planirano istraživanje jer se ono nadovezuje na njen uspješan rad sa oboljelim od cistične fibroze. Biohumoralna ispitivanja će se obaviti u VMA Beograd i novoformiranom centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Foči u saradnji sa stručnjacima iz ovih centara.

### **Publikacije kandidata su sljedeće:**

Selimović A, Mujičić E, Mesihović-Dinarević S, Pejčić T, Rančić M, Džinović A, Dizdar S, Moro M, Mustajbegović A, Rustempašić E, **Bakalović G**, Vukas E. The rate of Pneumococcal Pneumonia in children aged 2-6, over the period of November 2011-November 2012. HealthMED 2013;7 (8):2426-2431.

**Ganimeta Bakalović**, Amra Džinović, Amina Selimović, Selma Dizdar. Epidemiological Features of Bronchiolitis in the Pediatric Clinic of Clinical Center of Sarajevo University. Mater Sociomed. 2015 Jun; 27(3): 154-157.

**Ganimeta Bakalović**, Jovana Panić, Amra Džinović Selma Dizdar, Amina Selimović. Length of hospital stay in patients treated for bronchiolitis at the Pediatric Clinic in Sarajevo. Medical journal. 2015 (vol.21). No.4 277-280.

Selma Dizdar, Amra Džinovic, Refet Gojak, **Ganimeta Bakalovic**, Amina Selimovic. Descriptive Review of the Patients Suffering from Tuberculosis in the Past 10 Years Treated at Pediatric Clinic of Clinical Center of Sarajevo University. Med Arh. 2014 Oct; 68(5): 317-318.

Amina Selimovic, Ermina Mujicic, Selma Milisic, Senka Mesihovic-Dinarevic, Amra Dzinovic, Selma Cengic, **Ganimeta Bakalovic**, Mahir Moro, Meliha Djozic, Lada Lukic-Bilela. Analysis of Cystic Fibrosis in Federation of Bosnia and Herzegovina. Med Arh. 2015 Aug; 69(4): 222-225.

Selma Dizdar, Belma Paralija, Edo Hasanbegović, **Ganimeta Bakalović**, Amra Džinović, Verica Mišanović, Jasmina Fočo-Solak. Is pertussis a forgotten disease? Pertussis in infants admitted to

the Pediatric Clinic of the University Clinical Center Sarajevo. Medical Journal (2016) Vol. 22, No 3, 130 – 133.

**Ganimeta Bakalović**, Jovana Nišandžić. Risk factors for colonization and infections caused by carbapenemase-producing enterobacteria in hospitalized patients: a systematic review . Medical journal (2017) Vol. 23. No 2,3, 93-97.

## **Program i istraživanja (faze) i orijentacioni sadržaj doktorske disertacije**

U prvoj fazi (I) izrade doktorske disertacije biće definisan dizajn studije.

Druga faza (II) podrazumjeva sprovođenje planiranog istraživanja, prikupljanje podataka i unošenje podataka u protokol istraživanja.

U trećoj fazi (III), prikupljeni podaci biće statistički obrađeni i analizirani.

Doktorska teza će se sastojati iz nekoliko poglavlja:

1. Uvod u kojem se detaljno predstavljaju vladajući stavovi o cističnoj fibrozi, ulozi neutrofilnih granulocita i posebno o fenomenu citokinske disregulacije, povećanoj sintezi reaktivnih kiseoničnih vrsta, smanjenoj fagocitozi i fenotipskim karakteristikama neutrofilnih granulocita. U ovom dijelu se detaljno prikazuju svi teorijski okviri iz kojih proističe problem istraživanja.
2. Hipoteze i ciljevi istraživanja.
3. Materijal i metode (detaljan opis koncepcije istraživanja, obima istraživanja, navođenje kriterijuma za uključivanje i isključivanje ispitanika u/iz studije, detaljan opis imunskih testova, prikaz načina analize prikupljenih podataka i statističkih metoda koje će se primjeniti).
4. Rezultati (detaljan prikaz rezultata istraživanja kombinacijom teksta, tabela i grafikona).
5. Diskusija (tumačenje dobijenih rezultata i njihova analiza u odnosu na druga istraživanja sa sličnim ili različitim rezultatima; komentarisane postojećih saznanja u vezi sa dobijenim rezultatima; ukazivanje na eventualne nedostatke i ograničenja istraživanja).
6. Zaključci (navođenje osnovnih zaključaka studije koji proizilaze iz dobijenih rezultata).

## **Ispitanici, materijal i metode istraživanja**

Istraživanje je po tipu studije presjeka i obuhvatiće djecu starosti od 3 do 18 godina, kod kojih je postavljena ili potvrđena dijagnoza CF. Hronološki uzrast će biti izražen u decimalnom obliku prema Tanneru i sarad. Predviđa se da se istraživanje sprovede u roku od 24 mjeseca. U radu će se analizirati karakteristike bolesnika (uzrast, pol, nutritivni status, plućne funkcije) karakteristike bolesti (tip genetske mutacije, respiratorne, mikrobiološke i imunološke karakteristike). Ispitivanu grupu, koju ćemo označiti grupa A, će činiti najmanje 30 djece kod kojih je ranije, ili u toku ispitivanja postavljena dijagnoza cistične fibroze, a koji će biti podjeljeni u dvije podgrupe prema genetskoj mutaciji. Prvu podgrupu će činiti homozigoti za DF508 (klasa II), dok

drugu podgrupu će činiti heterozigoti DF508 i G542X (klasa I i klasa II), a koji se bolnički i ambulantno liječe na Klinici za dječije bolesti u Banjoj Luci, UB Foča, i u Institutu za zdravstveno zdravlje majke i deteta Srbije „ dr Vukan Čupić,, Novi Beograd Republika Srbija. Kontrolnu grupu, grupa B, će činiti 30 zdrave djece, istog pola i uzrasta kao i djeca u ispitivanoj grupi (matching groups) kod koje će se u sklopu redovnih sistematskih pregleda raditi rutinski laboratorijske analize (urednog su fizičkog nalaza, najmanje mjesec dana nisu imali znake akutne infekcije, bez podataka o postojanju hroničnih bolesti).

### **Kriterijumi za uključenje ispitanika**

1. Informisani pristanak ispitanika obje grupe (potpisan od strane roditelja za sve ispitanike do 10 godina) i potpisan od strane djeteta starijeg od 10 godina (prilog broj 1).
2. Uzrast od 3 do 18 godina
3. Djeca koja boluju od CF kod kojih je prisutna aktivna egzacerbacija plućne bolesti.
4. Dijagnoza CF treba da bude potvrđena podacima iz medicinske dokumentacije, fizičkim nalazom, kliničkim i genetskim ispitivanjima u skladu sa datim kriterijumima.

### **Kriterijumi za isključenje:**

1. Djeca koja trenutno imaju ili su u prethodnih mjesec dana imala akutnu infekciju ili druga akutna oboljenja
2. Hronična infektivna oboljenja
3. Bilo koja druga hronična bolest

### **Ispitanici grupe A**

Dijagnoza kod ispitanika grupe A je postavljena na osnovu kliničkih, biohemijskih i genetskih kriterijuma. Kod svih bolesnika je dijagnoza postavljena određivanjem koncentracije hlorida u znoju (znojni test), a vršena je standardnom tehnikom pilokarpinske jontoforeze, koja omogućava kvantifikaciju elektrolita u znoju. Pozitivnim testom smatrane su vrijednosti preko 60 mmol/L. Kod svih bolesnika je učinjena identifikacija dvije mutacije u genu za CF na Institutu za zdravstveno zaštitu majke i deteta „ dr Vukan Čupić,, Novi Beograd. DNK testiranje je vršeno na 29 načešćih mutacija.

Nakon određivanja epidemioloških i kliničkih karakteristika koje će se obuhvatiti uzrast, pol, tip mutacije, stepen uhranjenosti izražen kroz indeks tjelesne mase (BMI), tjelesna visina (TV) vršiće se procjena funkcije respiratornog sistema na osnovu čega će se procjenjivati stepen težine bolesti. Metode procjene funkcije respiratornog sistema podrazumijevaće procjenu plućnih funkcija mjerenjem vrijednosti forsiranog vitalnog kapaciteta (eng.FVC) i forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (eng FEV1). Funkcionalni plućni testovi biće mjereni pomoću Jaeger Master Scope spirometra (Jaeger GmbH, NJemačka) standardizovanom procedurom. Svakom djetetu će biti izmjerena visina i težina, te elektronski upisani lični podaci. Biće napravljeno tri mjerenja, a za interpretaciju nalaza biće izabrano mjerenje sa najbolje ostvarenim FVC i FEV1. Rezultati će biti izraženi u postocima (%) maksimalnog izdaha uz napor. Analizirane će biti plućne funkcije kod pacijenata starijih od sedam godina.



Procjena strukturnih promjena u parenhimu pluća će se vršiti na osnovu radiografije grudnog koša, koja će biti rađena iz dva pravca, u slučaju da nije učinjena u prethodna tri mjeseca. Snimci će biti skorovani na osnovu uočenih promjena prema Hrispin i Normanovom skor. Dokumentovana infekcija donjih disajnih puteva će značiti prisustvo kliničkih simptoma i znakova infekcije uz mikrobiološku potvrdu infekcije. Mikrobiološki potvrđena infekcija podrazumjevaće izolaciju uzročnika iz sputuma ili dubokog brisa ždrijela, a koji će biti zasijavan na hranjive podloge prema uobičajenoj laboratorijskoj proceduri. Korišćenjem raznovrsnih uobičajenih podloga (krvni, čokoladni, manitol slani, McConkey i Saboureaux agar), kao i posebnih podloga (BCSA – *Burkholderia cepacea* selective agar), uz pravilnu inkubaciju, biće omogućena identifikacija mikroorganizama koji kolonizuju disajne puteve oboljelih od CF. Osobine rasta mikroorganizama u kulturi i kvalitativne rezultate osjetljivosti na određene antibiotike obavlja će mikrobiolog, specijalizovan za pregled sputuma oboljelih od CF na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „dr Vukan Čupić,, Novi Beograd. Za potrebe ovog istraživanja, stanje hronične infekcije disajnih puteva *Pseudomonas aeruginosa* definisano je prema preporukama Evropskog respiratornog udruženja (ERS)(23).

Prisustvo pridruženih bolesti, bronhopulmonalna aspergiloza će biti definisana prisustvom minor i major kriterijuma. Major kriterijumi će podrazumijevati eozinofiliju  $>0.4 \times 10^9/l$ , pozitivan kožni test antigenom *Aspergillus*, visok nivo serumskog IgE, povišen nivo specifičnih antitijela na *Aspergillus*, reverzibilna bronhoopstrukcija, ponavljajući plućni infiltrati na radiografiji ( $>1$  cm ili segmentne atelektaze). Minor kriterijumi će podrazumijevati prisustvo *Aspergillus fumigatus* u kulturi iz sputuma, braon prebojen sputum, kasna koža reakcija. Astma će biti definisana prema Global inicijative za astmu (eng. The Global Initiative for Asthma, GINA) a prema uzrastu djeteta i težini kliničke slike (24).

Eksperimentalni dio istraživanja će podrazumijevati uzorkovanje krvi za procjenu oksidativnog praska, fagocitoze i fenotipskih karakteristika neutrofilnih granulocita kod ispitanika sa CF i kontrolne grupe. Krv će biti uzorkovana u epruvete ispunjene vakuumom sa dodatkom K2EDTA, a nakon učinjenog kliničkog pregleda obje ispitivane grupe. Iz uzorkovane krvi biće izolovani granulociti metodom sedimentacije sa 3% rastvorom dekstrana. Na taj način izdvojiće se plazma obogaćena leukocitima koja će biti nanesena na limfocitni separacioni gradijent. Nakon centrifugiranja (2200 rpm, 20 minuta na sobnoj temperaturi) izdvojiće se granulociti, a zaostali eritrociti će biti lizirani lizing puferom. Granulociti će biti resuspendovani u HBSS medijumu (Hank's balanced salt solution) bez kalcijuma i magnezijuma i kao takvi će se koristiti za dalje potrebe eksperimenta. Čistoća ćelijske suspenzije biće određivana bojenjem Türck-ovim rastvorom, a vijabilnost brojanjem ćelija u 0.2% rastvoru Tripan plavog (Sigma).

Intenzitet intracelularne i ekstracelularne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta biće mjereno hemiluminiscentnom metodom pomoću luminola, dok će samo ekstracelularna produkcija biti mjerena pomoću izoluminola. Izolovani granulociti periferne krvi obje grupe ispitanika biće postavljeni u bijele ploče od 96 mjesta sa ravnim dnom u koncentraciji  $2 \times 10^5$ /bazenu u HBSS+ medijumu (kalcijum i magnezijum, 10mM HEPES, 0,5% humani inaktivisani serum) u koji je dodat luminol ( $50 \mu M$ ), odnosno izoluminol ( $50 \mu M$ ). Nakon inkubacije od 30 minuta ćelije će biti stimulisane forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA;  $50 nM$ ), opsonizovanim zimozanom (OpZy;  $10 \mu g/ml$ ), lipopolisaharidom (LPS;  $200 ng/ml$ ) u kombinaciji sa N-formilmetionil-leucilfenilalaninom (FMLP;  $1 \mu M$ ), inaktivisanim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* (MOI 10) i kalcijum-jonoforom (CaI,  $1 \mu M$ ). Odmah nakon stimulacije mjeriće se intenzitet emitovane svjetlosti, koji je proporcionalan sintetisanim reaktivnim kiseoničnim vrstama, tokom 120 minuta, na svaka 3 minuta, pomoću multimodnog čitača (Synergy HTX).

Stepen intracelularne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta biće mjeren pomoću dihidrorodamina (DHR), citofluorimetrijskom metodom. Čelije u koncentraciji od  $1 \times 10^6$ /ml u HBSS+ medijumu će biti inkubirane u prisustvu različitih stimulusa: PMA (50nM), OpZy (10 $\mu$ g/ml), LPS (200ng/ml) + fMLP (1 $\mu$ M), inaktivisanim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* (MOI 10) ili CaI (1  $\mu$ M) sa dodatkom DHR (2 $\mu$ M). Nakon inkubacije od 30 minuta na 37°C ćelije će biti inkubirane na ledu 10 minuta, a zatim će intenzitet fluorescence biti mjeren na protočnom citofluorimetru (Attune).

Koncentracije IL-8, IL 10 i IL-17A biće mjerene iz supernatanata nestimuliranih kultura neutrofila obje grupe ispitanika, ali i kultura stimuliranih sa različitim stimulusima: PMA (50nM), OpZy (10 $\mu$ g/ml), LPS (200ng/ml) + fMLP (1 $\mu$ M), inaktivisanim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* (MOI 10) ili CaI (1  $\mu$ M) koristeći komercijalne ELISA kitove prema uputstvima proizvođača.

Intenzitet fagocitoze neutrofilnih granulocita periferne krvi obje grupe ispitanika biće mjerene pomoću protočne citofluorimetrije. Neutrofilni granulociti ( $2 \times 10^6$ /ml u HBSS+ medijumu) će biti aktivirani sa fMLP-om (1 $\mu$ M) u trajanju od 15 minuta, a zatim će u ćelijske kulture biti dodate inaktivisane opsonizovane bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* (MOI 25) koje su prije toga obojene fluorescentnom bojom, karboksifluorescein-sukcinimidil estarom (CFSE). Nakon jednočasovne inkubacije na 37°C, kulture će biti prebačene na led, u njih će biti dodato mišje antihumano anti-CD45 antitijelo konjugovano alofikocijaninom (APC) i inkubiraće se još 20 minuta. Procenat CFSE pozitivnih ćelija u CD45 pozitivnoj populaciji biće određivan pomoću protočnog citofluorimetra (Attune).

Fenotipske karakteristike nestimuliranih i neutrofilnih granulocita stimuliranih različitim stimulusima (PMA (50nM), OpZy (10 $\mu$ g/ml), LPS (200ng/ml) + fMLP (1 $\mu$ M), inaktivisanim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* (MOI 10) ili CaI (1  $\mu$ M)) će biti ispitivane na osnovu ispoljavanja karakterističnih površinskih i intracelularnih molekula. Za ovu metodu biće korišćena mišja monoklonska antitijela koja su specifična za humane antigene (CD11b, CD15, CD16, CD44, CD62L, CD64, CD66b, PDL-1, Dectin 1, TLR2, CCR5, ILT3, ILT4, IDO) konjugovana fluorescentnim bojama. Neposredno prije dodavanja antitijela, ćelije će biti isprane i resuspendovane u hladnom PBS sa dodatkom 0,01% natrijum azida u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  ćelija/50 $\mu$ l. U ćelijske suspenzije će prvo biti dodato blokirajuća antitijelo za Fc receptor, a zatim monoklonska antitijela u finalnim razblaženjima prema preporukama proizvođača. Čelije će biti inkubirane 30 minuta na +4°C, isprane i zatim analizirane na protočnom citofluorimetru (Attune).

### **Statistički metod**

U statističkoj obradi podataka biće korišćene metode klasične deskriptivne statistike (aritmetička sredina, medijana, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti i relativna frekvencija za atributivna obeležja).

Normalnost kontinualnih varijabli biće ispitivana Kolmogorov-Smirnov testom. Utvrđivanje razlika između grupa u slučaju kontinualnih varijabli biće korišćeni parametarski statistički testovi: za dvije grupe Studentov T test, a za poređenje više njih analiza varijanse (ONE-WAY ANOVA) sa Bonferoni korekcijom.

Za korelaciju vrijednosti kontinualnih varijabli biće upotrebljen Pearson-ov koeficijent korelacije, a u slučaju da između varijabli ne postoji linearna povezanost biće korišćen Spirmanov koeficijent korelacije.

Za upoređivanje studijskih grupa u pogledu zastupljenosti vrijednosti kategorijskih varijabli biće korišćen Hi kvadrat test pod uslovom da nijedna od vrijednosti nije jednaka nuli u nekoj od grupa ili da dve ili više vrijednosti u pojedinim grupama nisu zastupljene kod manje od 5 članova tih grupa. Ukoliko navedeni uslovi nisu ispunjeni, umesto Hi kvadrat testa će se koristiti Fišerov test. Kao statistički značajne biće uzimane vrijednosti u kojima je  $p < 0.05$ .

Za statističku analizu, te tabelarne i grafičke prikaze rezultata korišće se sljedeći softver:( IBM SPSS Statistics 21.0; MS Office Word 2010 i MS Office Excel 2010, GraphPad Prism 5).

### **Očekivani rezultati doktorske disertacije**

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju mogli bi da doprinesu razumijevanju poremećaja funkcije neutrofilnih granulocita kod bolesnika sa cističnom fibrozom. Posebno bi bilo interesantno i veoma značajno vidjeti kakav je uticaj različitih stimulusa na proces fagocitoze, oksidativni prasak i produkciju citokina neutrofilnih granulocita i njihovu efikasnost. Potrebno je utvrditi da li postoji korelacija dobijenih rezultata sa genetikom, kliničkom slikom, stadijumom bolesti, jer bi dobijeni podaci mogli poslužiti kao prediktori toka i prognoze bolesti kod pojedinačnih bolesnika, što omogućava raniju intervenciju i primjenu metoda liječenja prije nego što promjene postanu ireverzibilne. Očekujemo da ćemo upotrebom različitih stimulatora funkcije granulocita modifikovati njihov imuni odgovor, što bi moglo biti iskorišćeno kao dodatak terapiji ove bolesti.

### **Procjena potrebnog vremena izrade disertacije i mjesto istraživanja**

Klinički deo istraživanja će se obaviti u Klinici za dječije bolesti Univerzitetskog kliničkog centra u Banja Luci. Biohumoralni deo istraživanja će biti urađen na Medicinskom fakultetu VMA u Beogradu i Medicinskom fakultetu u Foči a statistička obrada podataka i njihova analiza na Medicinskom fakultetu u Foči. Za rad na ovoj disertaciji neophodno je 18 do 24 mjeseca, obzirom da se kadidat već od ranije bavi kliničkim istraživanjima u ovoj oblasti teze i da je savladao metodologije bazičnih istraživanja predviđenih u ovoj studiji.

### **Mentor, komentor, član komisije, njihove uže naučne oblasti i ustanove gdje su stekli zvanja**

1. Prof.dr Dejan Bokonjić, uža naučna oblast Pedijatrija, vanr.prof Medicinski fakultet u Foči, mentor
2. Prof.dr Predrag Minić, uža naučna oblast Pedijatrija, red.prof Medicinski fakultet u Beogradu, član komisije
3. Akademik, prof.dr Miodrag Čolić, uža naučna oblast Imunologija, red.prof Medicinski fakultet Foča, član komisije

### **Najznačajnije publikacije mentora, komentora i člana komisije koji se odnose na oblast istraživanja**

Bokonjic D, Stojnic N, Colic M, Mihajlovic D, Vasilijic S, Minic P, Vucevic D Impaired neutrophil extracellular traps formation in children suffering from cystic fibrosis. 14th

International Congress on Pediatric Pulmonology – CIPP XIV. Krakow, Poland, June 25-28, 2014. Poster presentation. Congress proceedings- supplement of Pediatric Pulmonology.

Ismaili B, Bokonjic D, Dolicanin Z, Colic M. Modulation of local cytokine network in chronic periodontitis by low-level laser therapy. European congress of immunology Vienna 2015. PB 19.19. str 289.

Bashkim Ismaili<sup>1</sup>, and Dejan Bokonjic. SHORT-TERM LOW-LEVEL LASER THERAPY ATTENUATES INFLAMMATION AND PRODUCTION OF INTERLEUKIN-1, BUT ELEVATES THE LEVEL OF MATRIX METALLOPROTEINASE 9 IN CHRONIC PERIODONTITIS. Journal of International Dental and Medical Research. 2014. Vol. 7. (1) 1-7. ISSN 1309-100X.

Bokonjic D., Vucevic D., Minic P., Vasilijic S., Mihajlovic D., Tomic S., Savic N, Popovic S., Colic M. Ligation of Toll-like receptors modify function of granulocytes in children suffering from cystic fibrosis. CIPP 2013. Valencia Congress proceedings- supplement of Pediatric Pulmonology.

Bokonjic D1. Minic P2, Vasilijic S3, Vucevic D3, Colic M3. Phenotypic and functional characteristics of monocyte derived dendritic cells in children suffering from Allergic bronchopulmonary aspergillosis. CIPP 2010. Vienna. Congress proceedings- supplement of Pediatric Pulmonology.

Minic PB, Sovtic AD. Exercise intolerance and exercise-induced bronchoconstriction in children. Front Biosci (Elite Ed). 2017; 9:21-32. M22, IF 2,484.

Sovtic A, Minic P, Kosutic J, Markovic-Sovtic G, Gajic M. Modified Chrispin- Norman score: correlation with peak exercise capacity and efficiency of ventilation in children with cystic fibrosis. Pediatr Exerc Sci. 2014; 26:259-65. M22, IF 2,085.

Baljosevic I, Minic P, Trajkovic G, Markovic-Sovtic G, Radojicic B, Sovtic A. Surgical treatment of severe laryngomalacia: Six month follow up. Pediatr Int. 2015;57:1159-63. M23, IF 0,952.

Stojnic N, Vasiljevic ZV, Djuricic SM, Arsenijevic VA, Minic P. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis in an immunocompetent, obese 10-year-old boy. Turk Pediatr. 2014; 56:654-7. M23, IF 0,638.

Marković D, Perić T, Sovtić A, Minić P, Petrović V. Oral Health in Children with Asthma. Srp Arh Celok Lek. 2015; 143:539-44. M23, IF 0,277.

Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A, Colic M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res* 2012; 52(1-2): 20-33.

Čolić M, Džopalić T, Tomić S, Rajković J, Rudolf R, Vuković G, Marinković A, Uskoković P. Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells. *Carbon* 2014, 67:273-287

Čolić M, Mihajlović D, Mathew A, Naseri N, Kokol V. Citocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 2015;22:763-778.

Đokic, J, S Tomic and M Čolic, "Cross-Talk Between Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Dendritic Cells," *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 51-65,

Tomić, S., Janjetović, K., Mihajlović, D., Milenković, M., Kravić-Stevović, T., Marković, Z., Todorović-Marković, B., Spitalsky, Z., Micusik, M., Vučević, D., Čolić, M., Trajković, V. Graphene quantum dots suppress proinflammatory T cell responses via autophagy-dependent induction of tolerogenic dendritic cells . *Biomaterials*, 2017, 146, pp. 13-28.

### **Izjava da li je prijavljivana teza pod istim nazivom na drugoj visokoškolskoj ustanovi**

Dr Ganimeta Bakalović nije prijavila tezu pod nazivom **ODNOS POREMEĆAJA FUNKCIJE GRANULOCITA PERIFERNE KRVI I KLINIČKE SLIKE DJECE OBOLJELE OD CISTIČNE FIBROZE** ni u jednoj drugoj visokoškolskoj ustanovi.

### **Reference koje je kandidat koristio za prijavu teze**

1. De Rose V, Molloy K, Gohy S, Pilette C, Greene CM. Airway Epithelium Dysfunction in CF and COPD. *Mediators Inflamm*. 2018 Apr 8;2018:1309746.
2. Quon BS, Wilcox PG. A new era of personalized medicine for cystic fibrosis - at last!. *Can Respir J*. 2015; Sep-Oct;22(5):257-60.
3. J. S. Elborn, "Cystic fibrosis," *The Lancet*, vol. 388, no. 10059, pp. 2519–2531, 2016.
4. Tingpej, P., Smith, L., Rose, B., Zhu, H., Conibear, T., Nassafi, K. Al, Manos, J., Elkins, M., Bye, P., Willcox, M., et al. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45, 1697–1704.
5. Hartl, D., Gaggar, A., Bruscia, E., Hector, A., Marcos, V., Jung, A., Greene, C., McElvaney, G., Mall, M., and Döring, G. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros*. 2012; 11, 363–382.

6. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in Cystic Fibrosis: An update. *Pediatr Pulmonol.* 2018 Nov;53(S3):S30-S50. doi: 10.1002/ppul.24129. Epub 2018 Jul 12. Review.
7. Rosen BH, Evans TIA, Moll SR, et al. Infection is not required for mucoinflammatory lung disease in CFTR-knockout ferrets. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197:1308–1318.
8. Marteyn BS, Burgel PR, Meijer L, Witko-Sarsat V. Harnessing Neutrophil Survival Mechanisms during Chronic Infection by *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Therapeutic Targets to Dampen Inflammation in Cystic Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Jun 30;7:243.
9. Montgomery ST et al. Interleukin-1 is associated with inflammation and structural lung disease in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* (2018)
10. Laval J, Ralhan A, Hartl D. Neutrophils in cystic fibrosis. *Biol. Chem.* 2016; 397(6): 485-496
11. Ralhan A, Laval J, Lelis F, Ballbach M, Grund C, Hector A, Hartl D. Current concept and controversies in innate immunity of cystic fibrosis lung disease. *J Innate Immun.* 2016;8(6):531-540.
12. Gifford AM, Chalmers JD. The role of neutrophils in cystic fibrosis. *Curr Opin Hematol* 2014; 21: 16–22.
13. Cockx M, Gouwy M, Van Damme J, Struyf S. Chemoattractants and cytokines in primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis: key players in chronic respiratory diseases. *Cell Mol Immunol.* 2018 Apr;15(4):312-323.
14. Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50:S39–S56.
15. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol* 2003; 81:1-44.
16. Gouwy M, Struyf S, Catusse J, Proost P, Van Damme J. Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 185–194.
17. Tješić-Drinković D, Tješić-Drinković D, Vraneš J, Votava-Raić A, Kelečić J, Gagro A. Imunološki aspekti plućne bolesti u cističnoj fibrozi. *Paediatr Croat* 2005; 49 (Supl 1): 139-144
18. Rada B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Pathogens.* 2017 Mar 9;6(1)
19. Furlan LL, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Salomão Junior JB, Souza DRS, Marson FAL. Variants in the interleukin 8 gene and the response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J).* 2017 Nov - Dec;93(6):639-648.

20. Schaaf B, Rupp J, Müller-Steinhardt M i sur. The interleukin-6 – 174 promoter polymorphism is associated with extrapulmonary bacterial dissemination in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Cytokine* 2005;31:324–8.
21. Dubin PJ, Kolls JK. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:L519–L528.
22. Taylor PR, Bonfield TL, Chmiel JF, Pearlman E. Neutrophils from F508del cystic fibrosis patients produce IL-17A and express IL-23dependent IL-17RC. *Clin Immunol*. 2016;170:53-60.
23. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev.*2013. *Immunol*. 13, 159–175.
24. Martínez-Alemán SR1, Campos-García L1, Palma-Nicolas JP1, Hernández-Bello R1, González GM1, Sánchez-González A1. Understanding the Entanglement: Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cystic Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Apr 6;7:104.
25. Gray RD, Hardisty G, Regan KH, Smith M, Robb CT, Duffin R, Mackellar A, Felton JM, Paemka L, McCullagh BN, Lucas CD, Dorward DA, McKone EF, Cooke G, Donnelly SC, Singh PK, Stoltz DA, Haslett C, McCray PB, Whyte MKB, Rossi AG, Davidson DJ. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax*. 2018 Feb;73(2):134-144.
26. Rada, B.; Leto, T.L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family nadph oxidases. *Contrib. Microbiol*. 2008, 15, 164–187.
27. Rada, B.; Hably, C.; Meczner, A.; Timar, C.; Lakatos, G.; Enyedi, P.; Ligeti, E. Role of nox2 in elimination of microorganisms. *Semin. Immunopathol*. 2008, 30, 237–253.
28. Cowland, J.B.; Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev*. 2016, 273, 11–28.
29. Tai, K.P.; Kamdar, K.; Yamaki, J.; Le, V.V.; Tran, D.; Tran, P.; Selsted, M.E.; Ouellette, A.J.; Wong-Beringer, A. Microbicidal effects of alpha- and theta-defensins against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun*. 2015, 21, 17–29.
30. van de Weert-van Leeuwen PB, van Meegen MA, Speirs JJ, Pals DJ, Rooijackers SH, Van der Ent CK, Terheggen-Lagro SW, Arets HG, Beekman JM. Optimal complement-mediated phagocytosis of *pseudomonas aeruginosa* by monocytes is CFTR-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49: 463–470, 2013.
31. Vlkova M, Chovancova Z, Nechvatalova J, Connelly AN, Davis MD, Slanina P, Travnickova L, Litzman M, Grymova T, Soucek P, Freiberger T, Litzman J, Hel Z. Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to

## ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

Kandidat Dr Ganimeta Bakalović ispunjava sve uslove da se može baviti naučno-istraživačkim radom, a predložena tema se bazira na nerešenom kliničkom problemu koji je u osnovi naučni problem. Prema tome tema je u potpunosti originalna, veoma važna sa kliničkog i istraživačkog aspekta. Rezultati koji iz nje proisteknu mogu pomoći unapređenju znanja iz oblasti patofiziologije cistične fibroze i poboljšanju liječenja oboljelih. Zbog svega navedenog Komisija predlaže Nastavno-naučnom vijeću Medicinskog fakulteta u Foči da prihvati ovaj projekat pod nazivom **ODNOS POREMEĆAJA FUNKCJE GRANULOCITA PERIFERNE KRVI I KLINIČKE SLIKE DJECE OBOLJELE OD CISTIČNE FIBROZE** i omogući Dr. Ganimeti Bakalović da pristupi izradi ove doktorske disertacije.

Foča, Novembar 2019. god.

Članovi komisije:

---

Prof. dr Dejan Bokonjić,

---

Prof. dr Predrag Minić

---

Akademik, prof. dr Miodrag Čolić