

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-76 од 15.12.2021. године, именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата Бакаловић Ганимете под насловом "Однос поремећаја функције гранулоцита периферне крви и клиничке слике дјеце обољеле од цистичне фиброзе"

(у даљем тексту: Комисија)<sup>1</sup> у сљедећем саставу:

1. Доц. др Душан Михајловић, ужа научна област Биохемија, Медицински факултет у Фочи, предсједник Комисије;
2. Академик Миодраг Чолић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије;
3. Проф.др Предраг Минић, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан Комисије.

Комисија је прегледала и оцијенила докторску дисертацију и о томе подноси Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву сљедећи

## **ИЗВЈЕШТАЈ**

### **о оцјени урађене докторске дисертације**

- |  |
|--|
| 1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области |
|--|

<p>Urađena doktorska disertacija, kojom su ispitivane epidemiološke i kliničke karakteristike dece obolele od cistične fibroze (CF) u Federaciji Bosne i Hercegovine (FBiH) i Republici Srpskoj (RS), kao i fenotipske karakteristike i produkcija citokina granulocita periferne krvi kod ove dece, obrađuju veoma važne teme koje su sa naučnog aspekta značajne. Ovo je prva studija koja je obuhvatila epidemiološke i kliničke karakteristike sve evidentirane djece oboljele od CF. S obzirom da na ovim prostorima još uvek ne postoji registar obolelih, prikazivanje epidemioloških i kliničkih podataka je od velike važnosti u cilju komparacije zdravstvenog stanja sa obolelom decom u drugim zemljama, članicama Registra Pacijenata Evropskog Društva za Cističnu Fibrozu (ECFSPR, eng. "European Cystic Fibrosis Society</p>
--

---

<sup>1</sup>Комисија има најмање три члана од којих најмање један није у радном односу на Универзитету

Patient Registry“). U nedostatsku registra, epidemiološke studije pružaju mogućnost uvida, kako u karakteristike bolesnika sa CF, tako i same bolesti. Ova doktorska disertacija mogla bi poslužiti kao ideja vodilja ka uvođenju neonatalnog skrininga za CF na ovim prostorima, u kom slučaju bi se imao uvid u tačan broj obolelih, a na taj način i sticanje uslova za formiranje CF centra i registra obolelih.

Upala igra ključnu ulogu u patologiji plućne bolesti kod CF i njenoj progresiji, a još uvek ne postoji efikasna antiinflamatorna terapija, što ovo područje čini veoma ineteresantnim i značajnim za istraživanja, kao i važnim terapijskim ciljem. Nijedna dosadašnja terapija nije uspela da sanira hroničnu upalu u plućima kod CF. Neophodne su nove terapije koje ciljaju ćelijske mehanizme upale, posebno neutrofile. Ovom studijom ustanovljena je povećana ekspresija integrina CD11b granulocita periferne krvi, koji je izuzetno važan u migraciji granulocita ka mestu upale, za razliku od prethodnih podataka u literaturi. S obzirom na ekscesivnu upalu u respiratornom traktu obolelih od CF, gde su dominantne upalne ćelije neutrofili, ovim nalazom bi se mogla objasniti robusna neutrofilna infiltracija pluća. Ovakav nalaz bi mogao poslužiti i kao terapijska meta u smislu njegove supresije. Merenjem produkcije citokina u supernatantima kulture granulocita, kako stimulisanih, tako i nestimulisanih, nađena je smanjena produkcija pro-inflamacijskog IL-18 koji bi mogao biti odgovaran za supresiju Th1 imunskog odgovora kod CF i poslužiti, takođe, kao terapijska meta.

Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli koristiti za dodatno proučavanje granulocita periferne krvi u cilju boljeg razumevanja njihovih funkcija i razvoja antiupalnih terapija, složenog inflamatornog odgovora, kakav je kod CF.

2. Оцјену да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Rezultati ovog rada su proizvod originalnih eksperimentalnih istraživanja. Određivanje IL-8, MCP, IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-33, IL-23 u supernatantima kulture granulocita periferne krvi, potom fenotipskih markera iz grupe adhezivnih molekula (CD15, CD11b, CD44, CD54 i hemokinskog receptora CCR5), imunomodulatornih molekula (PDL1, ILT3, IDO-1, ILT4), molekula koji učestvuju u prepoznavanju antigena (Dectin1, CD206, TLR2, CD14) i molekula važnih za funkciju neutrofila (NLRP3, CD16, MPO, FASL), kostimulaciju i antigenu prezentaciju (HLA-DR, CD86), kao i intracelularne produkcije proinflamacionih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-33) i Th citokina (IL-17, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4) kod dece sa CF, što do sada nije rađeno, predstavljaju originalan naučni doprinos kandidatkinje.

### 3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Kandidatkinja je ovim istraživanjem dobila značajne rezultate. Prvi put je opisana povećana ekspresija integrina CD11b stimulisanih granulocita periferne krvi kod dece sa CF, a kojim bi se mogla objasniti robusna infiltracija neutrofilima u disajnom putu, kao dominantno prisutnih upalnih ćelija. Povećana intracelularna produkcija antiinflamatornog IL-10 mogla je uticati na smanjenu produkciju IL-18, koji indukuje produkciju IFN- $\gamma$  u sklopu Th1 imunskog odgovora. Nižim nivoom IL-18 u supernatantima kulture granulocita periferne krvi kod dece sa CF, pre i nakon stimulacije, podržana je hipoteza suprimiranog Th1 imunskog odgovora kod CF

### 4. Оцјену о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему (по поглављима)<sup>2</sup>

#### **Uvod**

U poglavlju uvod kandidatkinja daje prikaz dosadašnjih saznanja iz literature koja su neposredno vezana za predmet doktorske disertacije. Kandidatkinja je u uvodu detaljno iznela poznate činjenice vezane za epidemiološku situaciju CF na evropskom kontinentu i ostatku sveta. Naglašen je značaj neonatalnog skrininga za ovu bolest i registra pacijenata kroz literaturne podatke zemalja kod kojih isti postoje već nekoliko decenija.

Kandidatkinja je u uvodu jasno iznela poznate činjenice vezane za upalu koja perzistira u plućima kod dece sa CF od najranije dobi i vremenom progredira. Detaljno su iznete i poznate činjenice vezane za ulogu neutrofila kao najbrojnijih upalnih ćelija u sklopu složenog inflamatornog odgovora, kao i uticaj transmembranskog regulatora provodljivosti za jone hlora (CFTR, eng.“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator“) na njihovu funkciju. Dalje se navode poznate fenotipske i funkcionalne karakteristike neutrofila, u smislu profila citokina, koje ove složene ćelije produkuju. Naučni problem istraživanja, da uloga neutrofila u aktivaciji specifičnog imuniteta nije dovoljno poznata, kao ni uloga njihovih fenotipskih molekula i kompleksne citokinske mreže, jasno je naznačen.

#### **Ciljevi**

U poglavlju ciljevi istraživanja, koji su usaglašeni sa hipotezama istraživanja, kandidatkinja je jasno postavila ciljeve da: ispita epidemiološke karakteristike deca sa cističnom fibrozom

<sup>2</sup>Испуњеност обима и квалитета у односу на пријављену тему, нарочито, треба да садржи: аналитички и системски прилаз у оцјењивању истраживачког постављеног предмета, циља и задатака у истраживању; испуњеност научног прилазу доказивања тврдњи или претпоставки у хипотезама, са обрадом података

u FBiH i RS; da ispita i uporedi produkciju IL-8, MCP, IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-33, IL-23 u kulturi granulocita periferne krvi, nestimuliranih i stimuliranih sa opsonizovanim zimozanom (OpZy), inaktiviranim opsonizovanim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) i preaktiviranih lipopolisaharidom (LPS), a potom stimuliranih N-formilmetionil-leucil-fenilalaninom (fMLP), kod dece obolele od CF i zdrave dece; da ispita i uporedi fenotipske markere iz grupe adhezivnih molekula (CD15, CD11b, CD11c, CD44, CD54 i hemokinskog receptora CCR5), imunomodulatornih molekula (PDL1, ILT3, IDO-1, ILT4), molekula koji učestvuju u prepoznavanju antigena (Dectin1, CD206, TLR2, CD14), molekula važnih za funkciju neutrofila (NLRP3, CD16, MPO, FASL), kostimulaciju i antigenu prezentaciju (HLA-DR, CD86), intracelularnu produkciju proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-33) i Th citokina (IL-17, TGF $\beta$ , IL-10, IL-4) granulocita periferne krvi, nestimuliranih i preaktiviranih sa LPS, a potom stimuliranih sa fMLP, kod dece obolele od CF i zdrave dece.

### **Материјал и методе**

Kandidatkinja je jasno opisala naučni metod istraživanja u ovom radu. Detaljno je opisan metod sakupljanja epidemioloških podataka, jasno su definisani kriterijumi za uključenje i isključenje iz studije i instrumenti kliničke procene dece sa CF. U eksperimentalnom delu studije, detaljno je opisan proces izolacije granulocita periferne krvi, korišćeni stimuli, način određivanja proinflamatornih citokina u supernatantima kulture granulocita periferne krvi, fenotipskih karakteristika i intracelularne produkcije proinflamatornih i Th citokina. Detaljno su navedena specifična monoklonska antitela korišćena u fenotipskoj analizi. U poglavlju materijal i metode precizno su definisane statističke metode za obradu podataka.

### **Rezultati**

Rezultati su jasno prikazani u vidu grafikona i tabela, pravilno obrađeni primenom adekvatnih statističkih metoda i jasno interpretirani. Pokazano je da epidemiološke karakteristike dece obolele od CF ne odstupaju bitnije od epidemioloških karakteristika drugih zemalja, članica ECFSPR. U eksperimentalnom delu studije pokazano je da granulociti periferne krvi dece sa CF, pre i nakon stimulacije, proizvode niže nivoe IL-18 u odnosu na kontrole i da imaju veću intracelularnu produkciju IL-10 iz grupe Th citokina nakon stimulacije. Prvi put je opisana povećana ekspresija integrina CD11b, nakon stimulacije, molekula koji je značajan za migraciju granulocita.

### **Diskusija**

Diskusija se sastoji od tri dela. U prvom delu, koji se odnosi na epidemiologiju CF,

kandidatkinja detaljno i stručno komentariše i analizira dobijene rezultate, poredeći epidemiološke podatke dece sa CF u Bosni i Hercegovini (BiH) sa epidemiološkim podacima kod dece sa CF u zemljama članicama ECFSPR, prvenstveno sa nama susednim državama. Drugi deo diskusije se odnosi na analizu detektovanih proinflamatornih citokina (MCP-1, IL-18 i IL-8) u supernatantima kulture granulocita periferne krvi kod dece sa CF, gde kandidatkinja vrlo detaljno analizira i komparira dobijene rezultate sa svim do sada rađenim studijama na ovu temu kod CF. Treći, i završni dio diskusije, se odnosi na analizu fenotipskih molekula i intracelularne ekspresije proinflamatornih i Th citokina neutrofila periferne krvi. Rezultate eksperimentalnog dela studije poredi i komentariše sa svim do sada rađenim studijama iz ove oblasti.

### **Zaključak**

U ovom poglavlju su jasno i taksativno navedeni najvažniji zaključci doktorske disertacije.

1. Epidemiološke karakteristike djece sa CF u Federaciji Bosne i Hercegovine i Republici Srpskoj su slične epidemiološkim karakteristikama CF drugih evropskih zemalja, članica ECFSPR.
2. U cilju uspostavljanja rane dijagnoze, tretmana i boljih ishoda, neophodno je uvođenje neonatalnog skrininga i CF centra za liječenje oboljelih na ovim prostorima.
3. Postoji pozitivna, statistički značajna korelacija između FEV1 i FVC sa BMI kod djece sa CF.
4. Hronična kolonizacija disajnog puta sa *Pseudomonas aeruginosa*, kao i ranija dob sticanja kolonizacije, značajno doprinose padu plućnih funkcija.
5. Neutrofili periferne krvi kod djece sa CF produkuju značajno niže nivoe IL-18 u odnosu na zdrave kontrole.
6. Ne postoji razlika u produkciji IL-8 i MCP-1 neutrofila periferne krvi kod djece sa CF u odnosu na zdrave kontrole.
7. Postoji pozitivna, statistički značajna korelacija između FEV1 i produkcije IL-8 neutrofila periferne krvi kod djece sa CF.
8. Neutrofili periferne krvi kod djece sa CF, nakon stimulacije, pokazuju značajno veće ispoljavanje integrina CD11b i veću intracelularnu ekspresiju IL-10 u odnosu na zdrave kontrole.

## Literatura

U radu je citirano 339 bibliografskih jedinica iz ove oblasti, koji su pravilno navedeni u tekstu i poglavlju Literatura.

Na osnovu navedenog, doktorska teza je po kvalitetu, obimu i složenosti ispunila ciljeve i zadatke postavljene u prijavi teze.

### 5. Научне резултате докторске дисертације

Sumiranje epidemioloških karakteristika dece sa CF sa područja FBiH i RS sa jedne strane, kao i definisanje fenotipskih karakteristika i citokinske mreže granulocita periferne krvi kod dece sa CF, predstavlja originalni naučni doprinos kandidatkinje.

### 6. Примјенљивост и корисност резултата у теорији и пракси<sup>3</sup>

Fenotipski markeri i produkcija citokina preaktiviranih granulocita periferne krvi kod dece sa CF, mogu poslužiti za ranu detekciju egzacerbacije plućne bolesti i na taj način omogućiti rani tretman i sprečiti teže egzacerbacije, ali isto tako poslužiti i za procenu odgovora na provedeni tretman. Sa druge strane, s obzirom da nijedna dosadašnja terapija nije uspela da sanira hroničnu inflamaciju u plućima kod CF, potrebne su nove antiinflamatorne terapije jer bi ciljanje neutrofila, u ovom slučaju citokina koje oni produkuju ili njihovih fenotipskih markera, mogli biti terapijska meta.

### 7. Начин презентирања резултата научној јавности<sup>4</sup>

Dr Ganimeta Bakalović je deo rezultata svoga istraživanja prikazala na 6. Evropskom kongresu Imunologa, održanom virtualno u septembru 2021. godine i u European Journal of Immunology (Volume 51, Suppl. 1, August 2021.). Rad za časopis je u pripremi.

<sup>3</sup> Истаћи посебно примјенљивост и корисност у односу на постојећа рејешења теорије и праксе

<sup>4</sup> Наводе се радови докторанта у зборницима и часописима у којима су објављени (истраживачки проблеми и резултати предмета истраживања докторске дисертације)

## 8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ<sup>5</sup>

Na osnovu detaljne analize doktorske disertacije pod nazivom „Odnos poremećaja funkcije granulocita periferne krvi i kliničke slike dece obolele od cistične fibroze“, Komisija je zaključila da je kandidatkinja izabrala aktuelnu i originalnu temu istraživanja koju je provela poštujući principe naučnog rada i koristeći savremene metode ispitivanja i analize rezultata. Dobijeni rezultati predstavljaju značajan doprinos savremenoj medicinskoj nauci, posebno u oblasti pulmologije i imunologije. Na osnovu svega navedenog, Komisija predlaže Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta u Foči, Univerziteta u Istočnom Sarajevu, da prihvati izveštaj o urađenoj doktorskoj disertaciji i odobri javnu odbranu doktorske disertacije dr Ganimeti Bakalović, u postupku sticanja zvanja, doktora medicinskih nauka.

Мјесто: Фоча

Датум: јануар, 2022.

Комисија:

1. Доц. др Душан Михајловић, ужа научна област Биохемија, Медицински факултет у Фочи, председник комисије



2. Академик Проф. др Миодраг Чолић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет у Фочи, члан комисије



3. Проф. др Предраг Минић, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет у Београду, члан Комисије

<sup>5</sup>У закључку се, поред осталог, наводи и назив квалификације коју докторант стиче одбраном тезе