

# NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.04.2024. godine, odlukom pod brojem 19/XXIII-4/3-AB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

## **„Prognostički značaj koncentracije citokina osovine IL-23/IL-17 u napredovanju fibroze jetre kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C i nealkoholnim steatohepatitisom“**

kandidata dr Ankica Vujović, zaposlene u Klinici za infektivne i tropske bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Srbije.

Mentor doktorske teze je prof. dr Ivana Milošević, Klinika za infektivne i tropske bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Srbije.

Komentor je prof. dr Marina Đelić, Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Miloš Korać**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Prof. dr Dušan Popadić**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. **Prof. dr Aleksandar Klašnjaja**, redovni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nastavno naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### **A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Ankice Vujović napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 103 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela, 35 grafikona i 13 slika. Doktorska disertacija sadrži još: podatke o komisiji, pismo zahvalnosti, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, spisak publikovanih radova, biografiju doktorandkinje, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** je opisana funkcionalna anatomija jetre, prikazane su sve njene funkcije, potom je detaljno opisana patogeneza fibroze jetre sa svim njenim aktuelnim aspektima. Definisana je

hronična bolest jetre (HBJ) uz prikaz njene epidemiologije, kliničke slike i načina dijagnostike, a potom jasno definisane bolesti kojima se istraživanje bavilo, hronični hepatitis C (HHC) i nealkoholni steatohepatitis (NASH). Za obe ispitivane bolesti dat je prikaz epidemiologije, kliničke slike i dijagnostike, potom detaljan prikaz aktuelnih saznanja o procesima patogeneze obe bolesti sa posebnim osvrtom na razvoj metaboličkog sindroma kod obe kao i odgovora imunskog sistema na hroničnu stimulaciju. Dat je poseban prikaz aktuelnih saznanja o aktivaciji i uticaju ose IL-23/IL-17 na razvoj ove dve ispitivane bolesti.

**Ciljevi rada** su precizno formulisani, a sastoje se od ispitivanja serumske koncentracije citokina osovine IL-23/IL-17 kod bolesnika sa HHC-om, NASH-om i zdravih kontrola. Drugi cilj bio je ispitivanje korelacije stadijuma fibroze jetre i serumske koncentracije citokina osovine IL-23/IL-17 kod bolesnika sa HHC-om i NASH-om.

U poglavlju **Materijal i metode** jasno su izneti detalji istraživanja. Definirano je da je u istraživanje uključeno ukupno 216 ispitanika starijih od 20 godina, da su ispitanici selektovani u Klinici za infektivne i tropske bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Srbije i da su bili podeljeni u tri grupe. Kod ukupno 156 ispitanika je klinički i laboratorijski dijagnostikovana HBJ. Prvu grupu je činilo 100 ispitanika sa serološki dokazanim HHC-om kod kojih je nakon biopsije jetre patohistološki potvrđena bolest. Kod svih je urađena laboratorijska obrada, a slučajnim uzorkovanjem je njih 50 selektovano je za imunološke analize. Nakon obrade i procene validnosti uzoraka 36 ispitanika iz ove grupe je imunološki ispitano. Kod preostalih 56 ispitanika sa HBJ je na osnovu anamneze, kliničke slike i laboratorijskih analiza postavljena sumnja na NASH, te je nakon biopsije jetre kod njih 20 potvrđena dijagnoza i oni su sačinjavali drugu grupu ispitanika. Objasnjeno je da je kod svih učinjena laboratorijska obrada, dok je zbog validnosti uzoraka njih 19 uključeno u imunološki deo istraživanja. Slučajnim uzorkovanjem odabrano je 60 zdravih kontrola ali je zbog isključujućih kriterijuma u kontrolnu, treću grupu konačno uključeno njih 28. Radi selekcije ispitanika, svi su bi bili podvrgnuti kliničkoj obradi koja je obuhvatala fizikalni pregled, laboratorijske i serološke analize, potom ispitivanje prisustva/odsustva autoantitela, i svima je bio urađen ultrazvuk abdomena. Svim ispitanicima je uzorkovana periferna venska krv za potrebe biohemijских, virusoloških i imunoloških analiza, dok je ispitanicima sa HBJ rađena i slepa, aspiraciona biopsija jetre radi patohistološke potvrde jedne od dve ispitivane HBJ kao i ispitivanja tkivnog imunskog odgovora. Opisano je da su radi preciznijeg uvida o uticaju ispitivane osovine na razvoj fibroze, HHC pacijenti dalje podeljeni u dve podgrupe - podgrupu sa nesignifikantnom fibrozom - HHC-NSF (stadijum fibroze: F0/F1/F2) koju je sačinjavalo 79 pacijenata, i podgrupu sa signifikantnom fibrozom/cirozom - HHC-SF (stadijum fibroze: F3/F4) koja je brojala 21 pacijenta, te da su laboratorijske analize statistički obrađene za sve ispitanike iz ove grupe, dok su imunološke analize iz plazme i tkiva jetre rađene za 36 pacijenata – 20 sa nesignifikantnom i 16 sa signifikantnom fibrozom jetre. Naglašeno je da je za ispitivanje citokina u krvi korišćena plazma umesto seruma s obzirom da je krv za sve ostale analize uzimana u epruvete za uzorkovanje plazme, te iz etičkih razloga, ispitanicima nije dodatno uzimana puna krv za izdvajanje seruma. Jasno je opisan ELISA proces kojim su merene koncentracije ispitivanih citokina osovine IL-23/IL-17 i to IL-6, IL-17A, IL-23 i IL-10 u plazmi i tkivnu.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno prikazani svi dobijeni rezultati. Rezultati su prikazani na 33 grafikona, 10 tabela i 5 slika.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Jasno je sumiran i prodiskutovan značaj dobijenih rezultata o koncentraciji citokina osovine IL-23/IL-17 kod HHC i NASH ispitanika i njihove povezanosti sa stadijumima fibroze jetre. Razmotreni su i citokini osovine IL-23/IL-17 kao potencijalni biomarkeri fibroze jetre kod bolesnika sa hroničnom bolešću jetre.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata doktorske disertacije, a konzistentni su sa postavljenim ciljevima istraživanja.

Pregled korišćene **Literature** sadrži spisak od 223 reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju odgovor citokina osovine IL-23/IL-17 i to IL-6, IL-17A, IL-23 i IL-10, na hroničnu stimulaciju kod dve HBJ, HHC-a i NASH-a. Vrednosti koncentracija sva tri proinflamatorna citokina (IL-23, IL-17A i IL-6) u plazmi bile su statistički značajno veće u HHC u poređenju sa zdravim kontrolama, kao i u NASH grupi takođe u poređenju sa zdravim kontrolama. Pored toga, statistički značajno veće koncentracije IL-17A izmerene su u NASH grupi u odnosu na HHC grupu ispitanika, dok su koncentracije antiinflamatornog IL-10 bile statistički značajno niže u HHC grupi u odnosu na NASH kao i u odnosu na kontrolnu grupu. Kada su analizirane podgrupe HHC, vrednosti IL-23 u plazmi bile su značajno veće u sve tri grupe ispitanika sa HBJ (HHC-NSF, HHC-SF i NASH) u odnosu na zdrave ispitanike, a uočena je i veća koncentracija u NASH grupi u odnosu na HHC-SF grupu bolesnika. Koncentracije IL-17A bile su značajno veće u HHC-SF i NASH grupama u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na HHC- NSF grupu ispitanika, dok su značajno veće koncentracije zabeležene i u NASH grupi u odnosu na HHC-SF grupu bolesnika. Vrednost IL-6 u plazmi bila je značajno veća u HHC-SF i NASH grupama u odnosu na zdrave ispitanike, dok između drugih grupa nije zabeležena statistička značajnost. Koncentracije antiinflamatornog IL-10 bile su statistički značajno niže u HHC-NSF i HHC-SF grupama u odnosu na kontrolnu grupu. U HHC-NSF grupi je ovaj citokin imao niže vrednosti u odnosu na HHC-SF grupu, dok je u NASH grupi vrednost IL-10 bila statistički značajno veća u odnosu na HHC-NSF i HHC-SF podgrupe. U HHC grupi ispitanika korelaciona analiza pokazala je da postoji negativna povezanost između stadijuma fibroze jetre i koncentracije IL-10 u plazmi, dok u NASH ispitivanoj grupi nije postojala značajna povezanost stadijuma fibroze jetre i koncentracije citokina osovine IL-23/IL-17. Plazma koncentracije IL-23 bi se mogle smatrati mogućim biomarkerom za procenu HHC-a sa nižim stadijumima fibroze (F0, F1 i F2), dok bi koncentracije IL-6 i IL-17A u plazmi mogli biti biomarkeri za predikciju HHC-a sa značajnom fibrozom i cirozom (F3 i F4). Između HHC-NSF i HHC-SF bolesnika pronađena je najsofisticiranija razlika

i to u koncentraciji citokina IL-10, te bi koncentracije ovog citokina ispod navedene vrednosti mogle sugerisati na HHC sa uznapredovalom fibrozom ili cirozom jetre.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U istraživanju koje je obuhvatila ova doktorska disertacija, ispitanici iz HHC i NASH grupe su imali veće koncentracije IL-23, IL-17A i IL-6 u plazmi u odnosu na zdrave ispitanike, dok je IL-17A bio značajno veći i u NASH u odnosu na HHC grupu ispitanika. Takođe, HHC ispitanici sa signifikantnom fibrozom kao i pacijenti sa NASH-om imali su značajno veće koncentracije IL-17A u plazmi u poređenju sa HHC pacijentima bez značajne fibroze i kontrolnom grupom, dok su sve tri HBJ grupe imale veće koncentracije IL-23 u poređenju sa zdravim kontrolama. Prethodne studije su pokazale da pacijenti sa HHC-om imaju povećane koncentracije IL-17A i IL-23 u poređenju sa zdravim ispitanicima (Meng i sar. 2016). Takođe, nedavno je objavljeno da su koncentracije ovih citokina povećane i kod pacijenata sa NASH-om u poređenju sa zdravom populacijom (Tang i sar. 2011; Belinchón-Romero i sar. 2021), što je sve u korelaciji sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Detektovane su i značajno veće koncentracije IL-17A i IL-23 u plazmi u NASH grupi u poređenju sa HHC-SF grupom, bez obzira na viši stepen fibroze u HHC-SF grupi (F3/F4 u HHC-SF u poređenju sa F0/F1/F2 u NASH grupi). Do sada u literaturi nisu poređene ove dve bolesti iz aspekta imunološkog odgovora, ali dobijeni rezultat može sugerisati da je osovina IL-23/IL-17 aktivirana na multifaktorijalan način kod NASH-a, s obzirom na složenu metaboličku patogenezu ove bolesti koja između ostalog uključuje i veći procenat telesnih masti u NASH u odnosu na HHC grupu ispitanika (što je pokazalo i istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije), a koje su i same izvor proinlamatornih citokina. Koncentracije IL-6 u plazmi bile su značajno veće u grupama HHC-SF i NASH u poređenju sa zdravim kontrolama. Prema istraživanju de Souza-Cruz i saradnika, HHC pacijenti sa teškom fibrozom jetre (F3/F4) imali su znatno više serumske koncentracije proinlamatornih citokina kao što su IL-6 i IL-17 (de Souza-Cruz i sar. 2016). Sa druge strane, Rau i saradnici su pokazali da su kod pacijenata sa NASH-om koncentracije IL-6 povećane u poređenju sa zdravom populacijom (Rau i sar. 2016). Oba ova rezultata su u skladu sa rezultatima dobijenim u disertaciji. U istraživanjima čiji su rezultati prikazani u ovoj disertaciji nisu pronađene razlike u koncentracijama IL-6 i IL-23 u plazmi između dve HHC podgrupe sa različitim stepenom oštećenja jetre, ali su koncentracije IL-17A bili značajno veće u HHC-SF grupi nego u HHC-NSF grupi. Važnost povećanih koncentracija IL-17 u različitim stadijumima HHC-a je ranije prepoznata (Cachem i sar. 2017; Cachem i sar. 2019) i čini se da igra važnu ulogu ne samo u progresiji HHC-a, već i u karcinogenezi i razvoju HCC-a. Naime, Askoura i saradnici su objavili studiju u kojoj je ispitivane koncentracije IL-17 kod 146 HHC pacijenata bez HCC-a, 45 HHC pacijenata sa HCC-om i 32 zdrave kontole. Povišena koncentracija IL-17A bila je u korelaciji sa stepenom fibroze jetre, a značajno veće koncentracije ovog citokina bile su kod HHC pacijenata sa razvijenim HCC-om, te je zaključeno da se ovaj citokin može smatrati biomarkerom za razvoj HCC-a (Askoura i sar. 2022). Koncentracije IL-10, jedinog antiinlamatornog citokina ispitivanog u sklopu disertacije, bile su značajno veće u kontrolnoj grupi u poređenju sa obe HHC grupe, dok je poređenjem podgrupa ustanovljeno da je koncentracija IL-10 bila veća u HHC-NSF u poređenju sa HHC-SF grupom. Jedna od prethodnih studija je pokazala smanjene koncentracije IL-10 u zdravoj populaciji u poređenju sa ispitanicima sa hroničnim hepatitisom (El-Emshaty i sar. 2015), što nije u korelaciji sa dobijenim rezultatima. Sa druge strane, Owusu

i saradnici su pokazali da je dvadeset pet procenata (41/163) anti-HCV pozitivnih pacijenata koji su se uspešno oporavili od HCV-a, imalo značajno veće koncentracije IL-10 u serumu u odnosu na pacijente sa aktivnom infekcijom (Owusu i sar. 2020). U grupi pacijenata sa NASH-om, koncentracije IL-10 su bile više u poređenju sa obe podgrupe pacijenata sa HHC-om, ali nije bilo razlike između NASH i kontrolne grupe. Jedna od studija na eksperimentalnim životinjama je pokazala više serumske koncentracije IL-10 u grupi u kojoj je indukovano NASH u poređenju sa kontrolnom grupom (Tsujimoto i sar. 2009), ali Vonghia i saradnici nisu utvrdili postojanje statistički značajne razlike u koncentracijama IL-10 u serumu kod NASH i KG (Vonghia i sar. 2015), što je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja u sklopu disertacije. Korelacionom analizom utvrđeno je da postoji negativna korelacija između koncentracije IL-10 u plazmi i stadijuma fibroze jetre. Značaj ovog citokina u progresiji fibroze jetre ispitali su i Ferreira i saradnici koji su otkrili veću ekspresiju IL-10 kod pacijenata sa blažim oblicima HHC u odnosu na one sa teškom fibrozom. Pored toga, zaključeno je da IL-10 može smanjiti ekspresiju proinflamatornih citokina u T-ćelijama, smanjiti ekspresiju kolagena tipa 1, ispoljavajući svoje antifibrotičke efekte (Ferreira i sar. 2023). Urađena je i analiza dijagnostičke tačnosti i pronađena značajna razlika u koncentracijama IL-10 u plazmi kod HHC-NSF u poređenju sa HHC-SF grupom (veće koncentracije u HHC-NSF grupi), te je IL-10 procenjen kao biomarker fibroze u HHC koji razlikuje pacijente sa nesignifikantnom od onih sa signifikantnom fibrozom, što sugerišu i neke od prethodnih studija (El-Emshaty i sar. 2015; Santiago i sar. 2021).

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

##### ***Rad in extenso u časopisu sa JCR liste:***

1. **Vujovic A**, Isakovic AM, Misirlic-Dencic S, Juloski J, Mirkovic M, Cirkovic A, Djelic M, Milošević I. IL-23/IL-17 Axis in Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Steatohepatitis-New Insight into Immunohepatotoxicity of Different Chronic Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):12483. doi: 10.3390/ijms241512483. (**M21, IF=6,204**)

##### ***Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:***

1. **Vujovic A**, Milosevic I, Đelić M. Uticaj imunološkog odgovora na razvoj fibroze kod hroničnih bolesti jetre različite etiologije. *Medicinski podmladak.* U štampi. Doi: 10.5937/mp76-48987.

#### **E) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „**Prognostički značaj koncentracije citokina osovine IL-23/IL-17 u napredovanju fibroze jetre kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C i nealkoholnim steatohepatitisom**”, autora **Ankice Vujović**, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi 2%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je ličnih imena, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, citata i upotrebe naziva internet domena, što je opravdano u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o

postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije

#### **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Prognostički značaj koncentracije citokina osovine IL-23/IL-17 u napredovanju fibroze jetre kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C i nealkoholnim steatohepatitisom“ dr Ankice Vujović predstavlja studiju preseka u kojoj je ispitan imunološki odgovor citokina osovine IL-23/IL-17 u hroničnim bolestima jetre različite etologije i prikazan njihov uticaj na progresiju fibroze jetre. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja uz poštovanje svih etičkih načela. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci. Hronične bolesti jetre predstavljaju značajan globalni zdravstveni problem, a dve koje su ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji smatraju se glavnim za indikovanje transplantacije jetre, te je shvatanje imunopatogeneze značajno ne samo u akademskom, već i potencijalnom lakšem dijagnostičkom i terapijskom pristupu. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da određeni citokini osovine IL-23/IL-17 mogu da nađu svoje mesto u dijagnostičkim protokolima, a dali su i novi uvid o patogenetskom uticaju na razvoj fibroze jetre kod HHC-a i NASH-a koji može biti temelj za dalja ispitivanja potencijalnog imunoterapijskog pristupa.

Na osnovu svega navedenog, a imajući u vidu dobijene rezultate istraživanja kandidatkinje, komisija predlaže Nastavno naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Ankice Vujović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 18.04.2024. godine

#### ČLANOVI KOMISIJE:

---

Prof. dr Miloš Korać

---

Prof. dr Dušan Popadić

---

Prof. dr Aleksandar Klašnja

#### MENTORI:

---

Prof. dr Ivana Milošević

---

Prof. dr Marina Đelić