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

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

Odlukom Nastavno-naučnog vijeća Medicinskog fakulteta u Foči Univerzitet u Istočnom Sarajevu od 21.09.2017.god. usvojen je prijedlog projekta kandidata mr sci.med.dr Olivera Ljuboja za izradu doktorske disertacije pod nazivom **PROCJENA POREMEĆAJA FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA KOD DJECE SA CISTIČNOM FIBROZOM** i imenovana 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. 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

  **IZVEŠTAJ**

O**snovni biografski podaci o kandidatu i njegovom stručnom radu**

Dr. Olivera LJuboja je rođen 1973. god. u Banjaluci, Republika Srpska, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije je završila na Medicinskom fakultetu u Banjaluci, 2000 god. Od februara 2001. godine primljena je u radni odnos na mjesto ljekara opšte prakse u Domu zdravlja Banjaluka, a od januara 2002. godine zaposlena je na Klinici za dječije bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske gdje i danas radi. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je u maju 2008. godine. Predmet najvećeg interesovanja joj je u toku specijalizacije bila oblast iz dječije pulmologije. Užu specijalizaciju iz dječije pulmologije završila je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u junu 2015. godine. Tokom obavljanja subspecijalističkog staža stekla je znanje i vještinu za izvođenje fleksibilne fiberbronhoskopije kod djece. Posebna sfera interesovanja u dječijoj pulmologiji su oboljeli od cistične fibroze. Član je Evropskog udruženja za cističnu fibrozu, (European cystic fibrosis society), kao i član Komisije za rijetke bolesti koja djeluje pri Centru za rijetke bolesti Republike Srpske. Od februara 2016. godine bila je uključena u veliki Evropski istraživački projekat o dostupnosti bronhoskopije u djece, koji je pokrenut u okviru Evropskog respiratornog udruženja (European respiratory society, ERS). Posredstvom ERS stekla je licencu o završenoj školi spirometrije. Dana 20.09.2016. godine magistrirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci na temu „Uloga visoko senzitivnog C- reaktivnog proteina kao nespecifičnog biomarkera upale kod djece sa astmom,,. Zaposlena je na mjestu višeg asistenta na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci. 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.

**Predmet i značaj istraživanja**

Cistična fibroza (CF) je najčešća monogenska nasljedna bolest kod ljudi bijele rase koja se prenosi autozomno-recesivno. Ovo je hronična, progresivna multisistemska bolest koja skraćuje i narušava kvalitet života, a najozbiljnije manifestacije bolesti nastaju na respiratornom sistemu. Incidenca bolesti iznosi između 1:2500 i 1:3500 novorođenčadi bijele rase, a srednje vrijeme preživljavanja ovih bolesnika je povećano sa 25 godina, koliko je iznosilo 1987. godine, na 38,3 godine koliko je iznosilo 2010. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (1).

 Gen za CF se nalazi na dugom kraku sedmog hromozoma i kodira sintezu proteina nazvanog CFTR (prema engl.Cystic fibrosis transmembrane regulator ), koji je transmembranski regulator provodljivosti za jone hlora. Kod bolesnika sa CF funkcija ovog proteina je narušena, što onemogućava izlazak jona hlora iz ćelija u lumen izvodnih kanala egzokrinih žlezda. CFTR takođe reguliše funkciju epitelnih natrijumskih kanala (ENaC) i u slučaju poremećene njegove funkcije dolazi do prekomerne apsorpcije jona Na u ćelije i povlačenja vode iz lumena kanala. Zbog toga u njima ostaje gust, viskozan sekret koji dovodi do opstrukcije lumena izvodnih kanala i stvara osnovu za razvoj kliničke slike CF.

 Najčešća mutacija u genu za CF je delecija fenilalanina na poziciji 508 (DF508) u sekvenci od 1480 aminokiselina koliko ima CFTR i prisutna je kod preko 80% obolelih. Ostale česte mutacije u Evropi su G542X, G551D, N1303K i W1282X. Mutacije se mogu podijeliti u šest klasa. Klasa I označava nedostatak sinteze CFTR (npr. G542X i 621+1G-t ); klasa II sintezu defektnog CFTR (npr. DF508); klasa III nepravilno otvaranje i zatvaranje jonskih kanala; klasa IV smanjene provodljivosti kanala i smanjenog broja prisutnih CFTR na ćelijekoj membrane (grupa V i VI). Težina klinička slike se smanjuje sa povećanjem numeričkih vrijednosti klasa. Do danas je poznato preko 1900 različitih mutacija koje dovode do nastanka bolesti (2). Genotipsko-fenotipska korelacija bolesti nije moguća za procjenu stepena bolesti pluća i jetre jer na težinu bolesti utiču i faktori sredine ali i različiti geni modikifatori, kao npr. gen za manoza vezujući lektin (MBL) koji je značajan činilac sistema urođenog imuniteta i značajan za uspješnu fagocitozu mikroorganizama (3).

 Stepen bolesti pluća kod bolesnika ca CF je danas glavni prediktor preživljavanja, pa je stoga razumjevanje patofizioloških mehanizama bolesti u disajnim putevima značajno i za blagovremeno liječenje. Danas se zna da borba za što duže preživljavanje u CF počinje rano, još prije nastanka prvih strukturalnih promjena u disajnim putevima. Odsustvo sistemskog imunskog poremećaja i hronične infekcije izvan disajnog puta upućuju na primarni poremećaj lokalnog odbrambenog sistema u disajnom putu kod bolesnika sa CF (4). U prilog lokalnog poremećaja govori povećana aktivnost neutrofilnih granulocita u bronhoalveolarnom lavatu u odnosu na zdravu populaciju koja, međutim, ne uspjeva da savlada jednom uspostavljenu bakterijsku infekciju. Bakterije koje kolonizuju disajne puteve oboljelih od CF u ranom uzrastu su: *Hemofilus influenzae* i *Stafylococus aureus,* a kasnije, kako bolest napreduje, pridružuju im se ili ih potpuno zamjenjuju *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacea, Stenotrophomonas maltofilia, Ahromobacter spp.(*5). Postoji nekoliko hipoteza koje dovode u vezu disfunkciju CFTR i ispoljavanje fenotipa bolesti. Posebno mjesto imaju hipoteze koje se temelje na promjeni volumena tečnog površinskog sloja na epitelnim ćelijama disajnog puta („airway-surface liquid“, ASL) i/ili smanjenju tečne sekrecije submukoznih žlijezda, te one koje naglašavaju kvalitativne promjene u sastavu (NaCl, pH, viskoznost) samog ASL-a (6). Ističe se i hipoteza prema kojoj je kod CF poremećen osnovni mehanizam urođene imunosti u disajnom putu, odnosno mehaničko čišćenje bakterija i drugih inhaliranih supstanci(tzv. klirens). Za uklanjanje sluzi u disajnom putu važna je funkcija sinhronizovanog kretanja cilija, sekrecija mucina i adekvatan volumen ASL. Važnost ASL je u njegovom učestvovanju u formiranju pericilijarnog tečnog sloja kao i u održavanju optimalne hidriranosti mucina. U normalnim disajnim putevima, adekvatan volumen ASL-a održava se mehanizmima apsorpcije natrijuma i sekrecije hlorida aktivnošću CFTR-a.

Kod CF u epitelu disajnog puta poremećene su dvije funkcije CFTR-a. Prva je gubitak inhibitornog djelovanja na tzv. epitelne natrijeve kanale, zbog čega je pojačana apsorpcija Na+, a druga je gubitak sposobnosti sekrecije hlorida, što dovodi do smanjenog volumena ASL-a. Zbog smanjenog volumena ASL, smanjen je volumen pericilijarnog sloja, te volumen sluzi u disajnom putu. Na taj način dolazi do poremećaja funkcije cilija i gubitka važne sposobnosti „podmazivanja“ čiji je učinak sprečavanje adherencije sluzi na površini disajnog puta. U praktičnom smislu, poremećaj pericilijarnog sloja uzrokuje poremećaj u mukocilijarnom klirensu i klirensu pomoću kašlja. Ovo bi bila tzv. „hipoteza malog volumena“ o uticaju transepitelnog poremećaja transporta elektrolita i vode na razvoj bolesti disajnih puteva. Druga važna hipoteza pokušava objasniti oštećenje lokalne antibakterijske odbrambene aktivnosti promjenama u sastavu ASL (7). Prema toj hipotezi, povećana koncentracija soli u ASL inaktivira djelovanje antimikrobnih peptida iz porodice defenzina (β-defenzin-1, β-defenzin-2). Aktivnost defenzina s drugim faktorima urođene imunosti u ASL sinergistički inhibira rast bakterija u disajnom putu. Ta je aktivnost u promijenjenom sastavu ASL odsutna. Promjene u ASL tumače se poremećajem u apsorpciji hlorida putem CFTR-a na način koji je analogan zbivanjima u znojnim kanalima. Teško je procijeniti koja od ove dvije hipoteze ima veću ulogu u objašnjavanju patogeneze CF. U svakom slučaju, bakterije se naseljavaju u gustom, viskoznom mukusu. CF ima jedinstven spektar patogenih uzročnika čije javljanje pretežno zavisi od uzrasta bolesnika. *Pseudomonas aeruginosa* je glavni uzročnik hronične kolonizacije i infekcije disajnih puteva u CF. Ovo se zasniva na činjenici da je kod bolesnika sa CF povećan broj sijaliziranih glikolipidnih receptora za P. aeruginosa na apikalnim membranama epitelnih ćelija. Veza između disfunkcije CFTR i neadekvatne glikosijalizacije je u povišenoj vrijednosti ćelijskog pH, te nemogućnosti intracelularnih organela da ga snize, čime se blokira aktivnosti enzima sijalotransferaze.

Promjene koje susrećemo kod *Pseudomonas aeruginosa* u CF mogu se objasniti i prikazati kroz nekoliko karakteristika. Tako postoji specifična metabolička aktivnost, tj. drugačija acetilizacija ili djelimični gubitak lipopolisaharidnog (LPS) dijela spoljašne membrane ćelije što onemogućava njegovu tipizaciju za serumsku aktivnost. Takođe, od osobitosti *Pseudomonas aeruginosa* kod bolesnika s hroničnom infekcijom ističe se još gubitak flagela što odražava njegove sposobnosti adaptacije u mukopurulentnom sekretu disajnog puta. Iako je isticana prisutnost mikrokolonija *Pseudomonas aeruginosa* tokom posljednjih godina, tek je relativno nedavno dokazano postojanje biofilma u disajnom putu bolesnika s CF. On predstavlja sesilnu zajednicu bakterija koja stvara agregate na površini, upotrebljavajući hidrolizirani polimerni matriks kao produkt vlastite sinteze. Zajedničke kliničke manifestacije rasta bakterija u biofilmu očituju se sporim rastom bakterija, povećanim stvaranjem antitijela koja su neefikasna u odstranjivanju bakterija, stečenom rezistencijom na antibiotike, te nemogućnošću odstranjenja biofilma, čak i kod bolesnika s intaktnim imunskim sistemom. Navedenom treba dodati još dva zapažanja koja su prisutna u disajnim putevima: 1. postojanje lokalne hipoksije unutar mukoznih čepova, što podstiče produkciju alginata od strane *Pseudomonas aeruginosa* i daljnjeg stvaranja biofilma; 2. prisutnost fenotipske varijante *Pseudomonas aeruginosa* koju karakteriše rezistencija na antibiotike, a koja ima naglašenu sposobnost stvaranja biofilma. Usljed prisustva ovog biofilma, bakterije koje rastu u njemu skoro su potpuno nezavisne od kiseonika, tj. infekcija je anaerobna. Ovaj biofilm smanjuje ingestiju neutrofila i inhibira aktivnost makrofaga, a zajedno sa neutrofilnom elastazom vrši destrukciju tkiva disajnih puteva. Posljedica svega navedenog je začarni krug zadržavanja mukusa, hronična infekcija i neutrofilna inflamacija.

**Hipoteze i ciljevi istraživanja**

Na osnovu dosadašnjih saznanja o ulozi neutrofilnih granulocita u patogenezi CF o stepenu neutrofilne inflamacije u disajnim putevima, nedovoljno poznatih funkcija neutrofilnih granulocita periferne krvi kod ovih bolesnika, a u cilju razumjevanja molekularnih mehanizama disfunkcije neutrofilnih granulocita kod oboljelih od CF, kandidat je postavio sljedeće hipoteze:

1. U oboljelih od CF preživljavanje neutrofilnih granulocita periferne krvi je povećano zbog smanjene apotpoze. Ovaj fenomen je praćen povećanom NET-ozom i sekrecijom proinflamacijskih citokina od strane neutrofilnih granulocita.
2. Postoji korelacija između stepena navedenih poremećaja funkcije granulocita periferne krvi sa tipom mutacija i težinom kliničke slike CF.

Za provjeru ovih hipoteza postavljeni su sljedeći konkretni ciljevi istraživanja:

1. Analiza epidemioloških i kliničkih karakteristika bolesnika sa CF sa različitim mutacijama.

2. Ispitivanje stepena spontane i indukovane apoptoze neutrofilnih granulocita periferne krvi i NET-oze u kulturi kod pacijenata sa CF i kontrolne grupe ispitanika i međusobno poređenje ovih procesa.

3. Ispitivanje produkcije proinflamacijskih citokina (IL-1β, TNF-α, IL-6 i IL-8) u kulturi granulocita periferne krvi pacijenata sa CF i poređenje sa nivoom ovih citokina u kulturi neutrofilnih granulocita kontrolne grupe ispitanika.

4. Ispitivanje korelacije stepena težine kliničke slike i gore navedenih funkcija neutrofilnih granulocita kod djece sa CF koji imaju različite mutacije.

**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 je dodatno daje na značaju istraživanja funkcije granulocita periferne krvi, obzirom da su do sada poremećaji uglavnom detektovani u inflamatornim ćelijama bronhoaleolarnog lavata.

**Pregled stanja u području istraživanja**

U sklopu urođenog imunskog sistema najznačajniju ulogu u borbi protiv infekcija imaju neutrofilni granulociti. Dugo vremena je vladalo mišljenje da ćelije urođenog imuniteta nespecifično prepoznaju i uništavaju različite mikroorganizme, ali zahvaljujući otkriću PAMP receptora (eng. pathogen-associated microbial pattern), a pogotovo TLR (eng. Toll-like) receptora koji se nalaze na površini i unutar ćelija urođenog imuniteta ovo mišljenje je modifikovano. TLR receptori pripadaju grupi sedam transmembranskih receptora i sastoje se od citoplazmatskog i ekstracelularnog domena. Najvažniji receptori na neutrofilnim granulocitima su TLR 2, 4 i 9. Nakon aktivacije TLR receptora odgovarajućim stimulusom dolazi do aktivacije signalnog puta koji može biti MyD-88 (mijeloidni diferencioni protein primarnog odgovora-88) zavistan ili MyD-88 nezavistan i u sklopu kaskadne reakcije dolazi do posljedične aktivacije i oslobađanja nuklearnog faktora – kapa beta (NF-kB) koji odlazi u jedro, gde indukuje ekspresiju target gena (8,9). Prenošenje signala preko TLR je prilično složen put i postoje različiti nivoi na kojima bi se mogao modifikovati imunski odgovor na bakterijske i gljivične mikroorganizme kod bolesnika sa CF.

Nakon aktivacije antigen prezentujućih ćelija patogenim mikroorganizmima u respiratornom traktu oslobađaju se različiti citokini i u zavisnosti od vrste patogenih stimulusa imunski odgovor se usmjerava u pravcu Th1, Th2 ili Th17 odgovora. Ukoliko je odgovor više usmjeren u pravcu oslabađanja IL-5, IL-4 i IL-10 dolazi do razvoja Th2 odgovora koji je nepovoljan za lokalni imunitet. Takođe, prekomjeran Th1 i Th17 odgovor može dovesti do prevelike inflamatorne reakcije na prisustvo patogena, koja dovodi do dodatnog oštećenja tkiva. Neutrofilni granulociti nakon stimulacije ispoljavaju antimikrobni efekat preko dva mehanizma: aktivacija NADPH zavisne oksidaze i formiranje reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS – superoksidni anjon i vodonik-peroksid) ili formiranje hloramina i hipohlorne kiseline nakon aktivacije mijeloperksidaze (MPO) i sa druge strane oslobađanje antimikrobnih proteina iz granula neutrofilnih granulocita (10). Azurofilne granule sadrže brojne antimikrobne proteine koji se oslobođaju u fagolizozomima. Karakterizacija različitih antimikrobnih motiva i peptida može poslužiti kao model za proizvodnju farmakoloških jedinjenja koji bi mogla biti efikasna u borbi protiv različitih mikroorganizama.

Neutrofilni granulociti mogu ostvarivati odbrambenu funkciju i putem stvaranja ekstracelularnih zamki odnosno mreža procesom koji se zove NET-oza (11). Za vrijeme fagocitoze antimikrobni agensi oslobođeni iz neutrofilnih granula i reaktivni kiseonični radikali (engl. reactive oxygen species) (ROS) obezbeđuju uslove za uništenje patogena (izlažu ih proteazama, fosfolipazama i katjonskim peptidima) (12). Takođe, neutrofil može da imobiliše patogena ekstracelularno oslobađanjem neutrofilnih ekstracelularnih zamki (engl. Neutrophil extracelular traps) (NETs). NETs su zamke sačinjene od ekstracelularnih vlakana, u čiji sastav ulazi DNK i brojni baktericidni proteini (MPO, neutrofilna elastaza, histoni). Molekuli koje oslobađaju neutrofili, uključujući i MPO, elastaza i katjonski proteini, takođe imaju važnu ulogu u aktivaciji urođene imunosti i produkciji inflamatornih citokina. Proces nastajanja netova je poseban tip ćelijske smrti neutrofila – NET-oza (13). Ovaj proces je pokrenut različitim stimulsima i karakteriše se aktivnim oslobađanjem hromatinskih vlakana koji sadrže antimikrobne peptide koji mogu zaustaviti i ubiti mikroorganizme. Ovo se postiže translokacijom neutrofilne elastaze iz primarnih granula u nukleus. Tu se parcijalno razgrađuju specifični histoni i zajedno sa MPO i reaktivnim jedinjenjima kiseonika, dovode do dekondenzacije hromatina i oslobađanje DNK iz ćelije. NETs stvaraju neutrofili usljed kontakta sa brojnim mikroorganizmima (bakterije, virusi, gljivice, paraziti), aktivisanim trombocitima, ili pod uticajem brojnih inflamatornih stimulusa ili hemijskih jedinjenja (13). Glavna funkcija NETs je zarobljavanje i uništavanje patogenih agenasa. Pri tome, ovaj proces je praćen dramatičnim promjenama morfologije ćelija. Glavne komponente NETs, DNK i antimikrobni proteini neutrofilnih granula, određuju njihova sveukupna antimikrobna svojstva. Patogeni, zarobljeni u ovim zamkama, bivaju uništeni oksidativnim i neoksidativnim mehanizmima. Takođe, utvrđeno je da hromatin i proteaze oslobođene u cirkulaciju za vrijeme formiranja NETs, mogu da regulišu prokoagulantne i protrombotičke faktore i na taj način učestvuju u nastanku tromba u krvnim sudovima. Proces NEToze, predstavlja poseban tip ćelijske smrti, različit od apoptoze i nekroze (14). Apoptoza se karakteriše kondenzacijom nuklearnog hromatina, DNK fragmentacijom bez dezintegracije membrane (15). Nekroza se karakteriše edemom ćelije, oštećenjem i rupturom plazma membrane bez primarne dezintegracije membrane jedra. Kod NET-oze, sa druge strane, dolazi do dezintegracije omotača jedra, bez DNK fragmentacije, gubitak unutrašnjih membrana i organela, i potom, mješanje nuklearnih i citoplazmatskih komponenti. Drugim riječima, NEToza je poseban vid ćelijske smrti različit od nekroze i apoptoze i biva pokrenut kontaktom sa patogenima, aktivisanim trombocitima, citokinima (kao što su IL-8, TNF) ili hemijskim jedinjenjima (PMA – forbol 12-miristat 13-acetat) (16). Postoje dve vrste NET-oze: suicidalna i vitalna NET-oza. U suicidalnoj NET-ozi nakon stimulacije dolazi do dekondenzacije hromatina u procesu u kome učestvuju NADPH zavisna oksidaza, MPO, neutrofilna elastaza, proteini azurofilnih granula, zatim sljedi hemijski proces citrulinizacije histona, oštećenja membrane jedra i oslobađanja DNK neutrofilnih granulocita u citoplazmu, gdje se ona jedini sa različitim antimikrobnim faktorima. Nakon perforacije ćelijske membrane dolazi do oslobađanja ovog kompleksa u spoljašnju sredinu i formira se mreža na površini neutrofilnog granulocita (17,18). Funkcija mreže je da se u nju “hvataju” mikroorganizmi i da ih ona svojim mikrobicidnim mehanizmima uništava, uključujući i one patogene koji ne mogu da budu fagocitovani. Još interesantniji fenomen je vitalna NET-oza. Do skoro je vladalo mišljenje da neutrofilni granulociti ne mogu da žive bez jedra. Ali, nakon fagocitoze mikroorganizama preko aktivacije TLR 2 i TLR 4 receptora neutrofilnih granulocita može doći do degradacije jedarne membrane i oslobađanja DNK koja se jedini sa histonima i proteazama i izlazi iz ćelije, a da pri tome ne dolazi do degradacije ćelijske membrane. Funkcija mreža je ista kao i kod suicidalne NET-oze, ali neutrofilni granulociti ostaju vitalni i mogu i dalje vršiti fagocitozu i hemotaksu, a dijelovi mikroorganizama ostaju fagocitovani (19). Stvaranja mreža kod vitalne NET-oze je skoro trenutan proces, dok kod suicidalne NET-oze on traje satima. Kod bolesnika sa CF je pokazano da *Pseudomonas aeruginosa* može da se veže za viskozni DNK od kojeg su mreže napravljene koristeći ih i za pravljenje sopstvenog biofilma, kao i da se hrani ekstracelularnim matriksom mreža, posebno u uslovima kada su one nefikasne (16). Sa druge strane davanje DNK-aze kod pacijenata koji imaju formirane mreže može dovesti do oslobađanja zarobljenih mikroorganizama i njihove lakše diseminacije po cijelom organizmu, kao i oslobađanja proteolitičkih faktora koji mogu oštetiti plućni parenhim i povećati inflamatorni odgovor.

**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 komleksnoj 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 povećen 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. Prilikom njihovog raspadanja oslobađa se velika količina DNK koja povećava viskoznost sekreta, mikrobicidni mehanizmi su oštećeni, ekstracelularne mreže nisu efikasne u otklanjanju mikroorganizama već više služe kao pogodni medijum za njihovo razmnožavanje i konačno 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, a saznanja se produbljuju na osnovu napretka u fundamentalnim saznanjima iz oblasti imunologije i ćelijske biologije. Upravo zbog navedenog, rezultati dobijeni u toku istraživanju mogli bi da doprinesu razumijevanju poremećaj funkcije neutrofilnih granulocita kod bolesnika sa cističnom fibrozom. Posebno bi bilo interesantno i veoma značajno vidjeti uticaj različitih TLR agonista i produkata *Pseudomonas aerugionosa* na proces stvaranja ekstracelularnih mreža neutrofilnih granulocita i njihovu efikasnost. Potrebno je zato 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 funkcije granulocita što bi moglo biti iskorišćeno 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 koji je sa kliničkog, biohemijskog, genetskog aspekta imao superviziju kompetentnog mentora kliničara pedijatra pulmologa. To pokazuje i rad koji je iz ove oblasti odbranjen u okviru subspecijalističkog završenog staža na Medicnskom fakultetu u Beogradu pod nazivom,, Primjena metodologije Evropskog registra kod bolesnika sa cističnom fibrozom iz Republike Srpske. Biohumoralna ispitivanja će 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:**

1. LJuboja O., Predojević-Samradžić J., Malčić-Zanić D., Marić N. Uloga visko senzitivnog C - reaktivnog protina kao nespecifičnog biomarkera upale kod djece s astmom. Respiratio. 2017; 7(1-2): 46-52.

2. Marić N., Petrović-Tepić S., Predojević Samardžić J., LJuboja O. Analiza rezultata amniocenteza urađenih na Univerzitetskom kliničkom centru Republike Srpske. Scripta Medica. 2017; 48:54-60.

LJuboja O., Suzić B., Đurđević-Banjac B., Stanimirović B., Malčić-Zanić D. Uticaj stanja uhranjenosti na učestalost egzacerbacije plućne bolesti i poremećaj plućne funkcije u djece oboljele od cistične fibroze. Pediatria Croatica. 2016; 60(3)248-249.

LJuboja O. Nutritivni alergeni u etiologiji atopijskog dermatitis kod djece. Zbornik radova, XVII simpozijum farmaceuta Republike Srpske sa međunardnim učešćem, Banjaluka. 2016.

LJuboja O, Konjević S., Malčić-Zanić D., Đurđević-Banjac B., Stanimirović B. Fiberoptička bronhoskopija u bronhološkoj ambulanti Klinike za dječije bolesti u Banjaluci- naše početno iskustvo. Respiratio. 2016; 6(1-2):251-255.

LJuboja O, Malčić-Zanić D., Konjević S., Stanimirović B, Đurđević-Banjac B. Membrana larinksa-prikaz slučaja. Respiratio. 2016; 6(1-2):247-250.

LJuboja O., Suzić B., Miljković V. Značaj rane detekcije i terapijske intervencije infekcije disajnog puta Pseudomonas aeruginosom kod bolesnika sa cističnom fibrozom. Zbornik radova, I Kongres pedijatar Republike Srpske sa međunarodnim učešćem. Banjaluka. 2016.

LJuboja O., Suzić B., Miljković V. Primjena metodologije Evropskog registra kod bolesnika sa cističnom fibrozom iz Republike Srpske. Zbornik radova, IKongres pedijatar Republike Srpske sa međunarodnim učešćem. Banjaluka. 2016.

**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 anaizirani.

Doktorska teza će se sastojati iz nekoliko poglavlja:

1. Uvod u kojem se detaljno se predstavljaju vladajući stavovi o cističnoj fibrozi, ulozi neutrofilnih granulocita i posebno o fenomenu potencijalno neefikasnih ekstracelularnih mreža koji stvaraju neutrofilni granulociti kod djece koja boluju od CF. U ovom djelu 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 imunksih 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; komentarisanje 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 istražaivanje sprovede u roku od 24 mjeseca. U radu su analizirane 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 su 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**

• 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).

• Uzrast od 3 do 18 godina

• djeca sa koja boluju od CF kod kojih je prisutna aktivna egzacerbacija plućne bolesti.

• Dijagnoza CF treba da bude potvrđena podacima iz medicinske dokumentacije, fizičkim nalazom, kliničkim i genetskim ispitivanjima u skladu sa datim kriterijumima.

Kriterijumi za isključenje:

• djeca koja trenutno imaju ili su u prethodnih mjesec dana imala akutnu infekciju ili druga akutna oboljenja

• hronična infektivna oboljenja

• 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 koncetracije hlorida u znoju (znojni test), a vršena 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 nalaz biće izabrano mjerenje sa najbolje ostvarenim FVC i FEV1. Rezultati će biti izraženi u postotcima (%) 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 skoru. 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 laboartorijskoj 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 eozinifiliju >0.4 x 109/l, pozitivan kožni test antigenom *Aspergillusa*, 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 fumigatusa u kulturi iz sputuma, braon prebojen sputum, kasna koža reakcija. Astma će biti definisana prema Global incijative za astmu (eng. The Gobal Intiative for Asthma, GINA) a prema uzrastu djeteta i težini kliničke slike (24).

Laboratorijska analiza podrazumijeva uzimanje krvi za procjenu funkcije neutrofilnih granulocita i ispitivanje procesa NET-oze kod ispitanika sa CF i kontrolne grupe. Krv za analizu će biti uzimana nakon učinjenog kliničkog pregleda u obje ispitivane grupe. Nakon uzimanja periferne krvi vršiće se izolacija granulocita putem sedimentacije sa 5% rastvorom dekstrana u toku 35 min. Pri tome će se najprije izdvojiti plazma obogaćena leukocitima koja će biti nanesena na Limfoprep gradijent. Nakon centrifugiranja (2200 rpm, 20 minuta na sobnoj temperaturi) zaostali eritrociti će biti lizirani lizing puferom. Na kraju će biti resuspendovani u HBSS medijumu (Hank's balanced salt solution). Čistoća ćelijske suspenzije biće određivana bojenjem Türck-ovim rastvorom, a vijabilnost brojanjem ćelija u 0.2% rastvoru Tripan plavog (Sigma). Ovako dobijeni neutrofili biće korišćeni prema potrebama eksperimenta.

Neutrofilni granulociti će biti kultivisani 4 ili 24 časa. U kratkotrajnoj kulturi (4 časa) biće određivana apoptoza i NET-oza. U dužoj kulturi (24 časa) biće sakupljeni supernatanti za određivanje proinflamatornih citokina. Apoptoza neutrofilnih granulocita biće određivana morfološkom analizom svježih i kultivisanih ćelija obojenih rastvorom Türck-a. Na multispot pločicu biće naneseno 10 μl ćelijske suspenzije, a zatim pokriveno pokrovnim stakalcem. Ćelije sa kondezovanim hromatinom ili kondezovanim i fragmentisanim jedrima će se smatrati apoptotskim. Uzorci će biti analizirani na svjetlosnom mikroskopu brojanjem najmanje 500 ćelija po preparatu. Vijabilnost ćelija biće procjenjivana nakon bojenja ćelijske suspenzije sa propidijum jodidom (PI) (10 μg/ml) i analize na protočnom citofluorimetru. Vijabilnost ćelija biće određivana po formuli 100% - % PI + ćelija. Apoptoza će biti dodatno analizirana i na protočnom citofluorimetru, nakon dodavanja PI (10 μg/ml) koji je rastvoren u hipotonom citratnom/Triton-X rastvoru i četvorosatne inkubacije u mraku. Detekcija apoptoze u najranijem stadijumu biće određivana pomoću (eng. Dead Cell Apoptosis Kit-a, Invitrogen Biosource, Karlsbad, SAD) koji sadrži Annexin V Alexa Fluor 488 i PI). Ispitivane ćelije će nakon kultivacije biti sakupljene i isprane u hladnom PBS-u, a zatim resuspendovane u komercijalnom puferu za „vezivanje“ (engl. binding bufer) i tretirane (Annexin V Alexa Fluor 488) i PI u skladu sa uputstvom proizvođača. Po isteku inkubacije od 15 minuta, na sobnoj temperaturi ćelijama će biti dodat pufer za „vezivanje“ i zatim će biti analizirane na protočnom citofluorimetru.

Stepen NEToze biće mjeren na osnovu fluorimetrijske metode sa manjim modifikacijama. Metoda se zasniva na mjerenju količine ekstracelularne DNK, koja je srazmjerna stepenu NEToze, koristeći (eng. Sytox green) ćelijski nepropustljivu, fluorescentnu boju koja se vezuje za DNK. Neutrofili će biti raspoređeni u crnoj ploči od 96 mjesta sa ravnim dnom u koncentraciji od 1h105/bazenu/200μl HBSS+ medijuma (HBSS medijum sa dodatim 0,5% FCS-om i 10nM HEPES-om). Ćelije će biti stimulisane sa PMA i inaktiviranim Pseudomonas aeruginosa bakterijama u cilju indukovanja NEToze. U određene bazene biće dodat Triton X-100 kako bi se izmjerila količina ukupne DNK. Nakon 2h inkubacije na 37°C, u inkubatoru za kulture ćelija, u prisustvu 5% SO2, u odgovarajuće bazene će biti dodata DNKaza i biće nastavljena inkubacija još 45 minuta pod istim uslovima. Nakon toga, u sve bazene biće dodat (eng. Sytox green) (20μg/ml). Intenzitet fluorescence biće čitan posle 15 minuta na čitaču za mikroploče (eng. Synergy HT, BIO-TEK). Količina ekstracelularne DNK (izražena kao procenat totalne DNK) biće izračunata na osnovu sljedeće jednačine (prikazan je primer sa PMA gđe je IF=intenzitet fluorescence; Neut=neutrofili)

Procenat totalne DNK= [IF (Neut + PMA) − IF (Neut + PMA + DNKaza)]/IF (Neutrofili + Triton X −100) × 100

Sposobnost neutrofila da sekretuju proinflamacijske citokine (IL-1β, TNF-α, IL-6 i IL-8) biće određen na osnovu mjerenja njihovih koncentracija u supernatantima nestimulisanih i stimulisanih kultura neutrofila sa različitim stimulusima (LPS, TLR 9 agonist, inaktivirani *Pseudomonas aeruginosa*, opsonizovani zimozan, fMLP) pomoću komercijalnih ELIZA kitova prema uputstvima proizvođača.

**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-Smirnof 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 kvadrant 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 kvadrant testa će se koristi Fišerov test. Kao statistički značajne biće uzimane vrijednosti u kojima je p < 0.05.

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

.

 **Očekivani rezultati doktorske disertacije**

Očekuje se da će rezultati ove doktorske disertacije doprinjeti razumijevanju poremećaja funkcije neutrofilnih granulocita kod bolesnika sa CF, pri čemu se fokus stavlja na granulocite u perifernoj krvi. Dobijeni podaci bi mogli poslužiti kao prediktori toka i prognoze bolesti kod pojedinačnih bolesnika, a što bi omogućilo raniju intervenciju i primjenu metoda liječenja prije nego što promjene postanu ireverzibilne. Očekuje se da će se upotrebom različitih stimulatora funkcije granulocita modifikovati njihov imuski odgovor, što bi moglo biti iskorišćeno za iznalaženje novih terapijskih modaliteta kod ove bolesti. Takođe se očekuje potvrda hipoteze da su funkcije granulocita periferne krvi kod CF izmjenjene pri ćemu poremećaj NET-oze ima poseban značaj. Stoga interpretacija svih dosadašanjih kliničkih rezultata i laboratorijskih ispitivanja jeste uslov da bi se dalje napredovalo u potrazi za varijetetima najboljih terapijskih mogućnosti za svakog pacijenta sa CF u budućnosti.

**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 statisička 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 gde 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 Ismaili1, 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.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25997357) 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.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388598) 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 Res2012; 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, Ј, 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 Olivera Ljuboja nije prijavila tezu pod nazivom PROCJENA POREMEĆAJA FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA KOD DJECE SA CISTIČNOM FIBROZOM ni u jednoj drugoj visokoškolskoj ustanovi.

**Reference koje kandidat koristio za prijavu teze**

1. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report 2010. Dostupno na[http://www.cff.org/UploadedFiles/LivingWithCF/CareCenterNetwork/PatientRegistry/2010-Patient-Registry-Report.pdf Preuzeto 26.04.2014](http://www.cff.org/UploadedFiles/LivingWithCF/CareCenterNetwork/PatientRegistry/2010-Patient-Registry-Report.pdf%20Preuzeto%2026.04.2014).
2. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. Annu Rev Biochem 2008; 77:701–26.
3. Chalmers JD, Fleming GB, Hill AT, Kilpatrick DC. [Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21045008) Glycobiology 2011; 21(3):271-82.
4. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. J Clin Investig 1999; 103: 303-7.
5. Li Puma JJ. Update on the Burkholderia cepacia complex. Curr Opin Pulm Med 2005; 11: 528-33.
6. Rhim AD, Stoykova L,  Glick MC, Scanlin TF. Terminal glycosylation in cystic fibrosis: are view emphasizing the airway epithelial cell. Glycoconj J 2001; 18(9):649-59.
7. Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G. [Antimicrobial peptides in the airway.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909921) Curr Top Microbiol Immunol 2006; 306:153-82.
8. Mifsud EJ, Tan AC, Jackson DC. [TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624130) Front Immunol 2014; 5:79.
9. Akira S and Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004; 4:499.
10. Lehrer RI and Ganz T. Antimicrobial peptids in mammalian and insect host defense. Curr Opin Immunol 1999; 11: 23-7.
11. Bryan G, Kubes P, Kubes Yipp. NETosis: how vital is it. Blood 2013; 122:2784-94.
12. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. J Lekoc Biol 2001;90:271-84.18.
13. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004;303:1532-5.
14. Fuchs T, a Abed U, Goosmann C, et al. A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol 2007;176: 231–41.
15. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. Front Immunol 2012;3:420.
16. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. [Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819131) Acta Biochim Pol 2013; 60(3):277-84.
17. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, [Fahey C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fahey%2520C%255BAuthor%255D&cauthor=true&cauthor_uid=21098229), [Yipp BG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yipp%2520BG%255BAuthor%255D&cauthor=true&cauthor_uid=21098229), [Sibley CD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sibley%2520CD%255BAuthor%255D&cauthor=true&cauthor_uid=21098229), et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. J Immunol 2010; 185(12): 7413-25.
18. Byrd AS, O Brien XM, Johnson CM, [Lavigne LM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lavigne%2520LM%255BAuthor%255D&cauthor=true&cauthor_uid=23509360), [Reichner JS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Reichner%2520JS%255BAuthor%255D&cauthor=true&cauthor_uid=23509360), et al. An extracelluar matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to Candida albicans. J Immunol 2013; 190(8):4136-48.
19. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. [Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21293492) Cell Death Differ 2011; 18(4):581-8.
20. Muhlebach MS, Noah TL. [Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934713) Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(7):911-5.
21. [Tirouvanziam R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tirouvanziam%2520R%255BAuthor%255D&cauthor=true&cauthor_uid=17299603). Neutrophilic inflammation as a major determinant in the progression of cystic fibrosis. [Drug News Perspect](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299603) 2006; 19(10):609-14.
22. Wong L.S., Demers M., Martinod K., et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis which impairs wound healing. Nature Medicine 2016; 21: 815-819.
23. Doring G, Conway S, Heijerman H, et al. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J 2000; 16:749–67.
24. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Intiative for Asthma (GINA), 2011. Dostupno na

 <http://www.ginasthma.org>.

**ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG**

Kandidat Dr Olivera Ljuboja 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 **PROCJENA POREMEĆAJA FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA KOD DJECE SA CISTIČNOM FIBROZOM** i omogući Dr. Oliveri Ljuboji da pristupi izradi ove doktorske disertacije.

Foča, decembar, 2017. god.

 Članovi komisije:

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 Prof. dr Dejan Bokonjić,

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 Prof. dr Predrag Minić

 \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 Akademik, prof. dr Miodrag Čolić