

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-8083/5-4 од 03.11.2010 године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Ивана Јовановића** под називом:

" Улога IL-33/ST2 сигналног пута на раст и развој тумора дојке. Модулација анти-туморске имуности "

На основу одлуке Изборног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Стипан Јоњић, редовни професор за ужу научну област Хистологија и ембриологија Медицинског факултета у Ријеци, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Иван Јовановић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

Иван Јовановић је рођен 02. 11. 1977. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву Крагујевачку Гимназију завршио је у Крагујевцу. Медицински факултет у Крагујевцу, уписао је школске 1996/97. године, а дипломирао 09. маја 2006. године са просечном

оценом 8,74 и тиме стекао звање доктора медицине. Обавио је општи лекарски стаж и положио стручни испит.

Од школске 2002/03. сарађивао је 2 године на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу као студент демонстратор.

2007. и 2009. године биран је у звање Асистента за ужу научну област Основи онкологије на Медицинском факултету у Крагујевцу.

Докторске академске студије, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу уписало је школске 2006/2007. године. Усмени докторски испит положио је 16.07.2008. године са оценом 10 (десет).

У школској 2008/2009. години уписао је специјалистичке студије из Имунологије.

Последипломско усавршавање "Advanced Laboratory Training Course: Viral Subversion of Immune Response" завршио је 2009. године на Медицинском факултету Универзитета у Риједи, Хрватска, у сарадњи са Хауард Хјуз Медицинским Институтом, С.А.Д.

Члан је Друштва имунолога Србије.

Б. Научно истраживачки рад

Још у току редовних студија кандидат Иван Јовановић је учествовао у научно-истраживачком раду. Од 2003. године активно се бавим научно-истраживачким радом у лабораторији за клиничку и експерименталну имунологију, Центра за Молекулску Медицину, Медицинског факултета у Крагујевцу. Континуирани рад огледа се у учешћу на Јуниор пројектима Медицинског факултета у Крагујевцу:

1. "Улога Галектина-3 и ST2 у активацији и функцији NK ћелија у туморским моделима" (бр. 01-9462)
2. "Имунски феномени код малигнух обољења" (бр.01-2106)
3. "Експресија p16, p53 и VEGF, и цитокински профил у малигномима колоректалне регије" (бр. 01-453)
4. "Значај цитокинског профила пацијената у етиопатогенези психотичних поремећаја" (бр.1-9336)

В. Подаци о објављеним радовима

Кандидат Иван Јовановић остварио је 32,1 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- ▣ четири рада у целини публикована у научним часописима међународног значаја;
- ▣ шест радова у целини публикована у националним часописима;
- ▣ већи број сажетака на међународним и домаћим научним скуповима

Од поменутих радова за извештај су релевантни:

1. **Jovanović I, Radosavljević G, Pavlović S, Zdravković N, Martinova K, Knežević M, Živić D, Lukić ML, Arsenijević N.** Th-17 cells as novel participant in immunity to breast cancer. *Serb J Exp Clin Res* 2010; 11(1):7-17. **M52 - 1,5 бодова**

2. Radosavljevic G, Ljujic B, **Jovanovic I**, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumour marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2010; 57(2):135-144. **M23 - 3 бода**
3. Djurdjevic P, Zelen I, Ristic P, **Jovanovic I**, Jakovljevic V, Baskic D, Popovic S and Arsenijevic N. Oxidative stress accelerate spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Journal of BUON* 2009;14(2):281-287. **M23 - 3 бода**

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

" Улога IL-33/ST2 сигналног пута на раст и развој тумора дојке. Модулација анти-туморске имуности "

Предмет:

ST2 молекула је члан Toll/IL-1 суперфамилије рецептора. Експримиран је на Th2 лимфоцитима и NK ћелијама и представља рецептор за IL-33, који појачава Th2 имунски одговор. У недостатку IL33/ST2 сигналног пута развија се превасходно Th1/Th17 имунски одговор, што је показано на бројним моделима за инфективне и аутоимунске болести. Ипак, улога IL33/ST2 сигналног пута у анти-туморској имуности није испитивана. Циљ овог истраживања је да се испита да ли и како недостатак IL33/ST2 сигналног пута утиче на раст и развој тумора дојке у експерименталном мишем моделу. Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја BALB/C и нокаут мишеве (ST2^{-/-}) на BALB/C подлози, женског пола, старости од 8 до 12 недеља. Туморе ћемо успостављати убризгавањем малигних ћелија (линије 4T1) директно у млечну жлезду број 4. Волумен примарног тумора пратиће се свакодневно, а 36.-ог дана уз величину примарног тумора одређиваћемо и број и величину метастатских колонија. Истог дана одређиваћемо и ниво цитокина у серуму. Тринаестог дана од инокулације тумора одређиваћемо целуларност и међусобне односе спленоцита као и сентинелног лимфног чвора. Истог дана одредићемо цитотоксичност спленоцита, NK ћелија, CD8 лимфоцита и адхерентних ћелија из слезине. Очекујемо успорену прогресију тумора у одсуству IL33/ST2 сигналног пута, што би се читавало као одложени и успорени раст примарног тумора, али и као смањење инциденце метастаза. Такође, очекујемо да ће антитуморска цитотоксичност укупних спленоцита и NK ћелија као и концентрације проинфламаторних цитокина у серуму бити већи код *knock-out* мишева. Добијени резултати могу да укажу да одсуство IL33/ST2 сигналног пута појачава анти-туморски одговор у моделу примарног тумора дојке, највероватније појачавањем цитотоксичне активности спленоцита и NK ћелија и продукције проинфламаторних цитокина.

Хипотезе:

1. Одсуство IL33/ST2 сигналног пута чини BALB/C мишеве резистентним на примарни тумор дојке, појачавајући анти-туморски имунски одговор.
2. Појачан анти-туморски одговор последица је повећане цитотоксичне активности спленоцита и NK ћелија мишева генетски дефицијентних у експресији ST2.

3. Повећан цитотоксични капацитет NK ћелија је последица промењених фенотипских и функционалних карактеристика NK ћелија.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат Иван Јовановић положио је усмени докторски испит 16.07.2008. године са оценом 10 (десет). У току студија објавио је четири рада у научним часописима међународног значаја и шест радова у националним часописима, од чега један у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Молекул ST2 је члан фамилије рецептора за интерлеукин 1, IL-1R. Овај протеин се јавља у два основна облика: солубилни (sST2) и мембрански облик (ST2L). ST2L је експримиран на површини Th2 лимфоцита, као и мастоцита, инваријантних iNKT ћелија, базофила, еозинофила, дендритских ћелија и NK ћелија. Специфични лиганд за ST2L је IL-33, новиооткривени члан IL-1 цитокинске фамилије, који везујући се за овај рецептор индукује секрецију IL-4, IL-5 и IL-13, што појачава Th2 имунски одговор. Супротно, остали чланови IL-1 фамилије цитокина (IL-1 β и IL-18) фаворизују Th1 имунски одговор.

ST2 *knock-out* мишеви показују смањену активност Th2 ћелија, што помера равнотежу лимфоцитних субсетова у правцу Th1/Th17 ћелија. То је показано у моделима инфективних, алергијских и аутоимунских болести. Ипак, нема литералних података о улози IL33/ST2 сигналног пута у анти-туморској имуности.

Карцином дојке је један од најчешћих малигних тумора код жена. Настаје акумулацијом генетских и фенотипских промена што резултира дисрегулацијом ћелијске пролиферације, диференцијације, апоптозе и механизма поправке DNA. Морбидитет је најчешће последица метастазирања у плућа, јетру, мозак кости. Карцином дојке је слабо имуноген, па ипак индукује анти-туморски одговор посредован и урођеним и стеченим имунитетом.

Иако Th2 лимфоцити могу да индукују „регрутовање“ туморицидних еозинофила и макрофага у окружење тумора што за резултат може имати акутно одбацивање тумора, Th1 лимфоцити ипак обезбеђују далеко ефикасније антитуморске механизме и обезбеђују дуготрајан антитуморски одговор CD8+T лимфоцита. Многа истраживања указују на повезаност Th1 имунског одговора и регресије тумора, док је одсуство регресије или прогресија тумора везана за Th2 имунски одговор.

NK ћелије представљају цитолитичке ћелије урођене имуности и чине прву линију одбране од малигних тумора. NK ћелије, *in vitro*, убијају различите типове туморских ћелија (поготову туморе хематопоезног ткива), пре свега оне које избегну лизирање од стране CTLs-а редуковањем експресије МНС молекула I класе. Смањењем експресије МНС молекула I класе туморске ћелије постају „лаке“ мете за NK ћелије. NK ћелије могу да се вежу за ћелије обложене IgG антителима, преко Fc рецептора. *In vivo*, улога NK ћелија је недовољно испитана, али је експреиментално доказано да код мишева са дефицитом T ћелија не постоји повишена инциденца спонтаних тумора јер имају нормалан број NK ћелија. Утврђено је да код пацијената са дефицитом NK ћелија постоји повећана инциденца лимфома. Мада су недавна истраживања показала да је ST2L молекул експримиран и на NK ћелијама, мало се зна о значају IL33/ST2 сигналног пута у анти- туморској активности ових ћелија. Због свега наведеног, било би од интереса испитати број, фенотип и капацитет цитотоксичности NK ћелија код ST2 дефицијентних мишева, у поређењу са нормалним BALB/C мишевима.

Дендритске ћелије представљају фамилију антиген презентујућих ћелија са јединственом морфологијом, површинским фенотипом и способношћу да активирају наивне Т лимфоците. Студија Maizumi-а и сарадника је показала да је ST2L експримиран на површини дендритских ћелија. IL-33/ST2 сигнални пут, индиректно преко GM-CSF-а, подстиче развој дендритских ћелија, али спречава њихово фенотипско и функционално сазревање. Дендритске ћелије добијене третманом са IL-33 су фенотипски и функционално незреле са смањеном осетљивошћу на лиганде TLR и смањеним капацитетом активације наивних Т лимфоцита. Такође, сматрамо да треба испитати број, фенотипску и функционалну зрелост дендритских ћелија у анти-туморском имунском одговору код ST2 дефицијентних мишева, у поређењу са нормалним BALB/C мишевима.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај IL33/ST2 сигналног пута на раст и развој тумора дојке у експерименталном мишјем моделу. У складу са овим општим циљем поставили смо и следеће специфичне циљеве:

1. Утврдити учинак одсуства ST2 гена на раст примарног тумора и инциденцу метастазирања.
2. Испитати значај ST2 молекула на цитотоксичну антитуморску активност леукоцита.
3. Упоредити „citoкинске профиле“ током анти-туморског имунског одговора код ST2 дефицијентних мишева и „нормалних“ BALB/C мишева.
4. Испитати утицај одсуства ST2 гена на ћелијски састав сентинелног лимфног чвора и слезине, пре и после индукције тумора.
5. Испитати како одсуство ST2 гена утиче на фенотипске и функционалне карактеристике NK ћелија и на њихов цитотоксични капацитет током индукције тумора.
6. Испитати могућу ћелијску и молекулску основу деловања IL-33/ST2 сигналног пута на активност цитотоксичних лимфоцита и NK ћелија у овом моделу.
7. Испитати како одсуство ST2 гена утиче на фенотипске и функционалне карактеристике дендритских ћелија у индукцији анти-туморског имунског одговора.

Ово истраживање нам може дати нове податке о улози IL33/ST2 сигналног пута на раст и развој тумора дојке, као и учинак у модулацији специфичне и неспецифичне анти-туморске имуности у експерименталном моделу тумора дојке код мишева.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У досада објављеној и доступној литератури сматра се да је ST2L молекула експримирана на Th2 лимфоцитима и да блокирање IL-33/ST2 сигналног пута супримира Th2, а промовише развој Th1/Th17 имунског одговора, што је показано на бројним моделима за инфективне и аутоимунске болести. Такође се сматра да је Th1 анти-туморски имунски одговор „пожељнији“ од Th2 одговора, јер обезбеђује далеко ефикасније антитуморске механизме. Ипак, нема литералних података о улози IL33/ST2 сигналног

пута у анти-туморској имуности. Наша студија би требало да по први пут испита да ли су мишеви генетски дефицијентни у експресији ST2 молекула и тиме без IL-33/ST2 сигналног пута резистентнији на тумор дојке.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње: Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја BALB/C и нокаут мишеви (ST2^{-/-}) на BALB/C подлози, женског пола, старости од 8 до 12 недеља. Све експерименталне и контролне групе у истраживању обухватиће по 50 животиња.

Индукција тумора: Тумори ће се индуковати апликацијом слабо имуногене малигне ћелијске линије 4T1, сингене за BALB/C мишеве. Туморске ћелије ће се убризгавати субкутано, директно у млечну жлезду број 4.

Мерење величине примарног тумора. Величина примарног тумора одређиваће се морфометријски. Запремина тумора се израчунава по формули $V (\text{mm}^3) = L (\text{већи пречник}) \times W (\text{мањи пречник}) / 2$ (Carlsson et al., 1983).

Верификација броја и величине метастаских колонија. Мишеви ће се жртвовати у етру, након чега им се узима крв из абдоминалне аорте. Изоловаће се примарна туморска маса, регионални лимфни чворови, слезина, плућа, јетра и мозак. Направиће се парафински препарати од ткива плућа, јетре и мозга и обојити еозин-хематоксилинским бојењем (стандардно патохистолошко бојење). Микроскопирањем, одредићемо број и величину метастатских колонија. Један део примарне туморске масе „оставити“ за детекцију леукоцитног инфилтрата (проточна цитометрија).

Одређивање серумског нивоа про-инфламаторних цитокина. Вредности про-инфламаторних цитокина одређиваћемо стандардном ELISA техником, коришћењем ELISA сетова специфичних за мишје цитокине (R&D Systems Minneapolis, MN), према упутствима произвођача.

Изолација ћелија. Након жртвовања мишева изоловаће се тумор дренирајући лимфни чворови и слезина. Пропуштањем поменутих органа кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) добиће се једноћелијска суспензија (леукоцити лимфног чвора и спленоцити). Кошишћењем анти-CD49b (DX5, Miltenyi Biotec) магнетима коњугованих антитела и пропуштањем предходно изолованих спленоцита кроз LS колоне магнетног MACS сепаратора изоловаће се NK ћелије. Такође, коришћењем анти-CD8 (Invitrogen) магнетима коњугованих антитела на претходно описан начин изоловаће се цитотоксични Т лимфоцити. Адхерентне ћелије (моноцити) изоловаће се лепљењем на пластику, након 2-часовне инкубације.

Цитотоксичност ћелија. Цитотоксичност спленоцита, NK ћелија, CD8 лимфоцита и адхерентних ћелија мериће се 4h MTT- тестом, након 24- часовне кокултивације ефекторских и туморских ћелија у различитим односима. Процент цитотоксичности одређује се по формули: $\text{цитотоксичност (\%)} = [1 - (\text{ефекторске и туморске ћелије (абсорбанца)} / \text{ефекторске ћелије (абсорбанца)})] \times 100$. Додатно, мерићемо експресију CD107 молекула на изолованим ћелијским популацијама, као индиректни доказ цитотоксичног капацитета.

Ћелијски састав тумор- дренирајућих лимфних чворова и слезине. Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, F4/80, Foxp3) одређиваћемо процентуални удео и укупан број различитих популација Т и В лимфоцита у дренирајућим лимфним чворовима и слезини.

Квантификација и фенотипизација НК ћелија. Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD3, CD19 и NKp46) одређиваћемо процентуални удео и укупан број НК ћелија у дренирајућим лимфним чворовима и слезини. Комбинацијом поменутих антитела са анти: KLRG, CD69, NKG2D, CD27 и CD11b одредићемо активациони статус НК ћелија пре и после апликације тумора. Такође, проточном цитометријом ћемо мерити процентуални удео и укупан број НК ћелија у слезини које продукују IFN-gamma пре и после инокулације туморских ћелија, интрацелуларним бојењем са анти IFN-gamma антителом.

Квантификација и одређивање матурационог статуса дендритских ћелија. Проточном цитометријом, коришћењем моноклонског антимишјег антитела (CD11c) мерићемо процентуални удео и укупан број дендритских ћелија у слезини. Комбинацијом CD11c антитела са анти CD80 и CD86 антителима одредићемо матурациони статус дендритских ћелија после апликације тумора. Такође, проточном цитометријом ћемо мерити процентуални удео и укупан број дендритских ћелија у слезини које продукују IL-12/IL-10 после инокулације туморских ћелија, интрацелуларним бојењем са антителима на релевантне цитокине.

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Предвиђени број животиња, по 50 у свакој групи, израчунат је према претпостављеној величини ефеката, задатој вредности коефицијента $\alpha=0.05$ и вредности снаге студије од 80%.

Врста студије

Експериментална студија

Статистичка обрада

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користићемо параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p<0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p<0,01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Ова студија би требало да по први пут испита да ли су ST2 дефицијентни мишеви резистентнији на успостављање тумора дојке (4T1), што би се манифестовало као закаснили раст примарног тумора и смањена инциденца метастаза. Очекивано је да разлог релативне резистенције ових мишева буде појачана анти-туморска активност, узрокована највероватније фацитирањем цитотоксичне активности леукоцита и продукцијом проинфламаторних цитокина.

Претпостављамо да је евентуална појачана цититоксична активност укупних спленочита код ST2 дефицијентних мишева у односу на нормалне BALB/C мишеве последица промењене активности NK ћелија.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи комплементарне експерименталне приступе *in vivo* и *in vitro*, мишеве генетски дефицијентне у експресији ST2 молекула, биће испитана улога IL33/ST2 сигналног пута на раст и развој тумора дојке у експерименталном мишјем моделу. Испитаћемо утицај одсуства IL33/ST2 сигналног пута на целуларност, међусобне односе и цититоксичност субпопулација ћелија у слезини и сентинелним лимфном чвору као и на цитокински профил.

2.10. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

2.11. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Стипан Јоњић, редовни професор за ужу научну област Хистологија и ембриологија Медицинског факултета у Риједи, члан

Закључак и предлог Комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Иван Јовановић испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације;
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна;
3. Комисија сматра да ће докторска дисертација кандидата др мед. Ивана Јовановића показати да IL-33/ST2 сигнални пут игра важну улогу у расту примарног тумора и инциденци метастазирања експерименталног тумора дојке код мишева, чинећи га потенцијалном метом у експерименталној терапији тумора;
4. Комисија предлаже Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Ивана Јовановића, под називом " **Улога IL-33/ST2 сигналног пута на раст и развој тумора дојке. Модулација анти-туморске имуности** " и одобри њену израду.

Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Миодрага Лукића, редовног професора за ужу научну област Микробиологија и имунологија Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу. Проф. др Миодраг Лукић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом, као и искуство и остварене резултате у развоју научно-наставног подмлатка.

У Крагујевцу
01.11.2010.г.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, председник, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија
-

2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, члан, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије
-

3. **Проф. др Стипан Јоњић**, члан, редовни професор Медицинског факултета у Риједи, Хрватска, за ужу научну област Хистологија и ембриологија
-