

Медицински факултет
Универзитет у Крагујевцу
Крагујевац

ВЕЋУ МЕНТОРА МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Оцена научне заснованости теме докторске дисертације

Одлуком Већа ментора Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу број: 01-7478/3-3 од 18.12.2008.године именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације Асс. Др Немања Здравковић под називом:

" Имунорегулаторни механизми у индукцији diabetes mellitus-а ниским поновљеним дозама стрептозотоцина "

На основу препоруке Научно-наставног већа комисија у саставу:

1. Проф. Др Миодраг Лукић - потенцијални ментор
 2. Проф. Др. Небојша Арсенијевић
 3. Проф. Др. Миодраг Чолић
- подноси Научно-наставном већу

ИЗВЕШТАЈ

I Биографски подаци

Кандидат Асс. Др Немања Здравковић испуњава све услове предвиђене Законом о универзитету и Статутом Медицинског факултета за израду докторске дисертације.

а. Лични подаци

Асс. Др Немања Здравковић рођен у Крагујевцу 21.09.1975.год, где завршава основну и средњу школу. 31.05.2002.год. дипломиро је на Медицинском факултету у Београду са просечном оценом 9,47 и стеко звање *доктора медицине*.

Уписо је последипломске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу где је 28.03.2007. год одбрано усмени докторантски испит.

24.12.2003 год засново је радни однос на Медицинском факултету у Крагујевцу у почетку на месту асистента приправника на предмету микробиологија и имунологија, а од 2008. год у звању асистента на истоименом предмету.

На Медицинском факултету у Крагујевцу 2008.године уписао је специјализацију из имунологије.

б.Научно истраживачки рад

Континуиран научно истраживачки рад Асс. Др Немања Здравковић огледа се у учешћу у истраживањима и публоковању радова у домаћим и међународним часописима као и презентацијама на конгресима и стручним скуповима.

ц. Списак радова

Радови штампани у целини у међународним часописима (P₅₁)

1. Nemanja Zdravković, Allen Shahin, Nebojša Arsenijević, Miodrag Lukić, Eric PK Mensah-Brown. REGULATORY T CELLS AND ST2 SIGNALING CONTROL DIABETES INDUCTION WITH MULTIPLE LOW DOSES OF STREPTOZOTOCIN. *Molecular Immunology (in press)*

Радови штампани као сажети у међународним часописима

1. Arsenijević AN, Zelen I, Zdravković N, Djukić A, Živančević- Simonović S, Baskić D, Mladenović V, Simić S, Jovanović I, Djurdjević P. Is glycosuria better parameter than glycemia for monitoring of glycoregulation during induction diabetes mellitus by multiple low doses of streptozotocin in C57BL/6 mice? *Материјали конференциј, Медицинска наука, Молодџь и современность Смоленск 2007; 2*

Радови штампани у целини у домаћим часописима са рецензијама (P₆₁)

1. Nemanja Zdravković, Sladjana Pajović, Gordana Radosavljević, Dušica Zdravković, Ivan Jovanović, Suzana Popović, Dejan Baskić, Slobodan Zdravković, Nebojša Arsenijević. REDUCING THE PHAGOCYtic ABILITY OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS. Ser J Exp Clin Res 2008; 9(3): 89-92
2. Vesna Milić, Dejan Baskić, Nemanja Zdravković, Nebojša Arsenijević. NITRIC OXIDE AND IFN- γ PLASMA LEVELS IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS. Ser J Exp Clin Res (*in press*)

Радови штампани као сажети у домаћим часописима

1. Djukić A, Živančević- Simonović S, Djurdjević P, Baskić D, Zdravković N, Mladenović V, Jovanović I, Popović S, Radosavljević G, Arsenijević NN. Efekat propiltiouracila na funkciju fagocita periferne krvi kod osoba sa hiperfunkcijom štitaste žlezde. XXXII Oktobarski zdravstveni dani- sažeci radova, Medicinski časopis 2007; 41(1) Suppl. 1: 19
2. Zdravković N, Djukić A, Živančević- Simonović S, Baskić D, Mladenović V, Jovanović I, Popović S, Djurdjević P, Radosavljević G, Lukić M. Dinamika promene biohemijskih parametara glikoregulacije tokom indukcije malih, ponovljenih doza streptozotocina miševima soja C57BL/6. XXXII Oktobarski zdravstveni dani- sažeci radova, Medicinski časopis 2007; 41(1) Suppl. 1: 22

Радови саопштени на међународним скуповима (P₇₂)

1. Nemanja Zdravković Aleksandar Đukić, Ivan Jovanović, Nebojša Arsenijević, Miodrag L Lukić. Regulatory Mechanisms in Low Dose Streptozotocin Diabetes Induction. Ser J Exp Clin Res 2008; 9 Suppl. 1: 104

II Подаци о предложеној теми

Предложена тема је из области имунологије

а. Предмет рада

Diabetes mellitus тип 1 је аутоимунско обољење у коме аутореактивне Т ћелије инфилтришу Langerhans-ова острваца у панкреасу узрокујући разарање β ћелије (1). Превенција дијабетеса тип 1 захтева рано спречавање развоја аутоимуног процеса за који се сматра да је резултат поремећеја у имунорегулацији. У diabetes mellitus-у тип 1 Th1 субсет (IFN- γ) (2) помажућих Т лимфоцита надвладава Th2 субсет (IL-4) (3) узрокујући запаљенски процес у Langerhans-ovih острвцима (insulinitis) и доводи до деструкције β ћелија (4).

Недавно је потврђено да се имунска толеранција не стиче само централним механизмима делецијом потенцијално аутореактивних клонова, већ и имунорегулаторним механизмима који одржавају толеранцију на периферији (5). Вероватно је ова регулација мултифакторијална са учешћем различитих ћелијских механизма. Показано је да Treg ћелије имају значајну улогу у оваквом виду нисходне регулације у аутоимуности (6, 7).

Treg ћелије и Th2 ћелије супримирају развој дијабетеса тип 1, што је потврђено великим бројем експеримената на NOD мишевима. Индукција дијабетеса тип1 малим поновљеним дозама стрептозотоцина један од прихваћених модела за испитивање утицаја генетских фактора и фактора средине у настанак и развој овог обољења (8, 9). Крајем деведесетих је откривен још један субсет помажућих Т лимфоцита, то је Th17 субсет (10,11). Показано је да IL-23 и IL-17 зависни пут има значајну улогу у многим аутоимунским обољењима, па тако и у MLD-STZ индукованом diabetes mellitus-у тип 1 (12).

ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ

А.

Генерални циљ ове студије је да се расветле неки механизма оштећења β ћелија Langerhans-ових острваца панкреаса.

У складу са овим општим циљем поставили смо и следеће специфичне циљеве:

1. Утврдити дејства СТХ-а на Treg ћелије у току иницијације diabetes mellitus-а тип 1 код C57BL/6 мишева.
2. Утврдити улогу ST2 сигнасиња у Th2 лимфоцитима у развоју diabetes mellitus-а тип 1 код BALB/C мишева.
3. Испитати улогу Th17 помажућих Т лимфоцита у патогенези diabetes mellitus-а тип 1

Б.

Доминантну улогу у оштећењу панкреаса има Th1 субсет помажућих Т лимфоцита, док Treg ћелије супримирају развој diabetes mellitus-а тип 1.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Мишеви

У експериментима су коришћени девет недеља стари мужијаци мишева C57BL/6, BALB/C, BALB/C ST2-/- knockout.

Мишеви соја C57BL/6 су подељени у четири групе - три експерименталне и једну контролну. Мишеви из експерименталних група су пет узастопних дана интраперитонеално примали инјекцију стрептозотоцина (STZ) у дози 40 mg /kg телесне масе раствореног у цитратном пуферу (pH 4.48). Прецизна дневна доза је добијена на основу почетне телесне масе сваког миша. Мишеви из прве експерименталне групе су такође петог и седмог дана од почетка експеримента (ИП у супротни бок) примали и циклофосфамид (СТХ) у дози 175mg/kg раствореног у физиолошком раствору, док су мишеви из друге експерименталне групе примали једну дозу cyclophosphamide (СТХ) у дози 175mg/kg раствореног у физиолошком раствору, петог дана до почетка експеримента. Контролна група мишева је пет узастопних дана интраперитонеално примала инјекцију цитратног пуфера(pH 4,48).

Мишеви соја BALB/C ST2-/- knockout (Al Ain University, UAE) BALB/C.cy подељени у две групе - једну експерименталну и једну контролну. Обе групе су пет узастопних дана интраперитонеално примали инјекцију стрептозотоцина (STZ) у дози 40 mg /kg телесне масе раствореног у цитратном пуферу (pH 4.48). Прецизна дневна доза је добијена на основу почетне телесне масе сваког миша.

Одређивање гликемије и гликозурије

Ниво глукозе (Abbott Exccide) је свакодневно мерена у крви добијене из репне вене мишева након гладовања од 4h. Ниво глукозе из мокраће мишева је свакодневно мерена test trakom Uroscan 2.. Гликемија и гликозурија су мерене сваког дана експеримента почев од првог дана , пре убризгавања супстанци, па до четрдесетог дана експеримента, када су сви мишеви жртвовани.

Хистолошка анализа инфилтришућих ћелија

Мишеви су жртвовани у етру након чега су им извађени панкреаси и перипанкреасни лимфни чворови од којих су направљени парафински исечци. Исечци, дебљине 4-5µm, су добијени коришћењем микротоме, а затим су обојени хематоксилином и еозином (H&E). Обојени препарати служе за бројање лимфоцитних инфилтрате у Лангерхансовим острвцима панкреаса светлосним микроскопом користећи објектив са увеличањем 40 X (13,14).

ELISA

Мишеви су жртвовани у етру, након чега им је крв извучена из абдоминалних аорти и центрифугирана 10 мин на 3000 об. Серум је појединачним иглама и шприцевима одвојен из крви и одложен у замрзивач на -20°C до анализе. Мерени су серумски нивои три цитокина: IFN-γ, TNF, IL-17 коришћењем ензимоимунотест (ELISA) кита (R&D Systems Minneapolis, MN) специфичног за мишије цитокине, уз сагласност са написаним протоколом.

Стандарди за мерене цитокине су растворени у ПБС-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације за IFN-γ, TNF буду 2000 pg/ml, а за IL-17 1000 pg/ml. Затим је направљена серија од седам двоструких разблажења почетних концентрација стандарда у Reagent Diluent-у, да би се формирала крива стандардна.

Разблажено Capture Antibody (100 µl) је сипано у бунаре микротитар плоча и остављено да се инкубира преко ноћи на собној температури, након чега је испрано

у Wash Buffer–у. Испитивани серуми су разлажени у четири пута (1:4) у Reagent Diluent–у. Одговарајућа разблажења стандарда (100 μ l) и испитиваних серума (100 μ l) су супана у опране бунаре обележене Capture Antibody и остаљена да се инкубирају 2 сата на собној температури. Након завршене инкубације и испирања у сваки бунар је додато Detection Antibody (100 μ l) и остаљено да се инкубира 2 сата на собној температури. По завршеној инкубацији и испирању у све бунаре је сипан Streptavidin-HRP (100 μ l) и остављен да се инкубира (без дирекног излагања сунчевој светлости) 20 мин. на собној температури, након чега је урађено поновно испирање и додавање Substrate Solution (100 μ l), па Stop Solution (50 μ l). Резултати су очитани ELISA читачем на 450nm таласне дужине (15).

ВРСТА СТУДИЈЕ

Експериментална студија

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна девијација (СД). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$. Пре статистичке обраде података, прво се испитује правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Ако је број вредности мањи од 50 за проверу се користи Shapiro-Wilk тест, а ако је узорак већи од 50 користи се Kolmogorov-Smirnov. На основу добијене вредности p одређујемо тест који користимо за статистичку анализу. Тако да ако је $p < 0,05$ вредности имају правилну расподелу и користи ћемо параметарски Т – тест, а ако је $p > 0,05$ користи ћемо непараметарски Mann-Whitney тест.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ И ЗНАЧАЈ СТУДИЈЕ

Diabetes mellitus тип 1 је аутоимунско обољење са значајим учешћем Т лимфоцити у њеном настајању и развоју, али и са још увек недовољно испитаном улогом ових ћелија у појединим фазама развоја болести. Зато је важно утврдити да ли постоји разлика како у броју тако и у самом месту лимфоцитних инфилтратата у Лангерхансовим острвцима панкреаса на основу којих можемо боље сагледати

њихово учешће у настајању insulinitis-a. Коришћењем ST2 knockout мишева моћићемо јасно да уочимо улогу ST2 сигнаписања у Th2 лимфоцитима у развоју аутоимунског процеса. С обзиром да се недовољно зна о супресивном ефекту Treg лимфоцита, веома је важно утврдити да ли постоји разлика у броју ових ћелија у панкреасима експерименталних и контролних мишева, што би могло да укаже на улогу и значај ових ћелија у контроли дијабетеса тип 1. Поред испитивања самих ћелија имунског система, проучавањем ниво појединих цитокина IL17, IFN- γ и TNF могу се стећи сазнања: о улози и односу појединих субпопулација CD4+ Т лимфоцита на развој аутоимунске реакције; о утицају самих цитокина на развој болести; као и о улози специфичне и неспецифичне имунсти у настајању промена у панкреасу код diabetes mellitus тип 1. На основу добијених резултата ове експерименталне студије моћићемо боље да сагледамо значај специфичног и неспецифичног имунитета у патогенези diabetes mellitus тип 1.

III Закључак и предлог комисије

ЗАКЉУЧАК

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, Асс. Др Немања Здравковић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан кроз поделу експерименталних и контролних група животиња код којих ће се:
 - a) Испитати дејство CTX-a на Treg ћелије у току иницијације diabetes mellitus-a тип 1 код C57BL/6 мишева,
 - b) Испитати улога ST2 сигнаписања у Th2 лимфоцитима у развоју diabetes mellitus-a тип 1 код BALB/C мишева.
 - c) Испитати улога Th17 помажућих Т лимфоцита у патогенези diabetes mellitus-a тип 1
3. Комисија сматра да ће докторска теза Асс. Др Немања Здравковић, под менторством проф. Др.Миодраг Лукић, представити темељну студију која ће показати улогу Treg и Th17 ћелија у току иницијације diabetes mellitus-a тип 1 код C57BL/6 мишева, као и значај ST2 сигнаписања у Th2 лимфоцитима у развоју diabetes mellitus-a тип 1 код BALB/C мишева.

4. Комисија предлаже **Др.Миодраг Лукић** Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Асс. Др Немања Здравковић под називом:

" ИМУНОРЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ У ИНДУКЦИЈИ DIABETES MELLITUS-A НИСКИМ ПОНОВЉЕНИМ ДОЗАМА СТРЕПТОЗОТОЦИНА "
ПРЕДЛОГ МЕНТОРА

За ментора рада комисија предлаже **Проф Др.Миодраг Лукић**, редовног професора Медицинског факултета у Крагујевцу.

Председник Комисије

Проф.Др. Небојша Арсенијевић

Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Научна област: Имунологија, онкологија

Проф. Др.Миодраг Лукић

Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Научна област: Имунологија

Проф. Др.Миодраг Чолић

Редовни професор на ВМА, Београд

Научна област: Имунологија
