

НАУЧНОМ ВЕЋУ

МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Научног већа Медицинског факултета Универзитета у Београду, одржаној дана 13.06.2016. године, именована је комисија за оцену завршне докторске дисертације под насловом:

„*IL-33/ST2* осовина у експерименталном моделу акутног запаљења“

кандидата др Марије Станковић, запослене на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Ментор је Проф. др Александар М. Трбовић.

Комисија за оцену завршне докторске дисертације именована је у саставу:

1. Проф. др Силвио Р. Де Лука, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду
2. Проф. др Милош Марковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду
3. Доц. др Биљана Драшковић Павловић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршне докторске дисертације једногласно подноси Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Дисертација др Марије Станковић написана је на 181 страни и подељена је на следећа поглавља: увод, циљеви рада, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци и литература. У дисертацији се налази укупно 24 слике, 2 табеле и 2 схеме. Дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику, биографију кандидата, податке о комисији и списак скраћеница коришћених у тексту.

У **уводу** су најпре описани основни начини комуникације између ћелија. Потом су представљена сазнања о интерлеукину-33 (*IL-33*), *ST2* рецептору и до сада неразјашњеној улози *IL-33/ST2* осовине, која у различитим обољењима може имати различиту улогу – про- и анти-запаљењску. Дефинисано је запаљење и детаљније објашњено акутно запаљење, а затим су представљени васкуларне и ћелијске промене у запаљењу и медијатори запаљења. Описана су дејства слободних радикала и оксидативног стреса на оштећење ткива у запаљењу, као и улоге цитокина фактора

некрозе тумора-алфа (*TNF-alfa*), интерлеукина-6 (*IL-6*), интерлеукина-12p35 (*IL-12p35*) и фактора трансформације раста-бета (*TGF-beta*). Указано је на значај коришћења експерименталних модела акутног запаљења и мишева којима је уклоњен ген за *ST2* рецептор ради стицања нових сазнања о механизмима акутног запаљења и улози *IL-33/ST2* осовине. Описане су физиолошке улоге, а потом и промене и значај промена концентрације гвожђа, хемоглобина, магнезијума, калијума, бакра, мангана, селена, редукованог глутатиона и активности глутатион пероксидазе и супероксид дизмутаза у запаљењу.

Циљеви истраживања су прецизно дефинисани и у њих се сврставају: одређивање биохемијских показатеља оштећења ткива, квантитативно одређивање степена запаљења и некрозе на основу анализе структуралних промена ткива, анализирање генске експресије цитокина на месту запаљења у експерименталном моделу акутног запаљења у односу на *IL-33/ST2* осовину. Циљеви истраживања су и одређивање хематолошких параметара, концентрације макроелемената и микроелемената и параметара антиоксидативне заштите на месту акутног запаљења у експерименталном моделу акутног запаљења у односу на *IL-33/ST2* осовину.

У поглављу **материјал и методе** је јасно и детаљно описан експериментални дизајн и методологија која је коришћена за проверу циљева истраживања. Коришћени су генетски неизмењени *BALB/c* мишеви и *BALB/c* мишеви којима је уклоњен ген за *ST2* рецептор (*ST2*^{-/-}). Животиње су подељене у четири групе: контролна група генетски неизмењених мишева, контролна група мишева којима је уклоњен ген за *ST2* рецептор, експериментална група генетски неизмењених мишева код којих је изазвано акутно запаљење и експериментална група мишева којима је уклоњен ген за *ST2* рецептор код којих је изазвано акутно запаљење, а потом је детаљно описан експериментални модел акутног запаљења. Фотометријским методама су одређене активности креатин киназе и аспартат аминотрансферазе у серуму, док је за анализу генске експресије цитокина на месту акутног запаљења коришћена ланчана реакција умножавања полимеразом праћена у стварном времену са реверзном транскрипцијом (*qRT-PCR*). Хематолошки параметри крви су одређени хематолошким анализатором, а процентуално учешће еритроцита у слезини прављењем размаза на плочицама. Описана је метода атомске апсорпционе спектрометрије којом су одређене концентрације макроелемената и микроелемената на месту акутног запаљења, као и спектрофотометријске методе којима су одређени садржај редукованог глутатиона и активности глутатион пероксидазе и супероксид дизмутаза на месту акутног запаљења. Описани су припремање и анализа хистопатолошких препарата обојених хематоксилином и еозином, одређивање волуменске густине запаљењског инфилтрата и некротичних ћелија и параметара фракталне и текстуалне анализе. Наведени су тестови који су коришћени за статистичку анализу резултата.

У поглављу **резултати** детаљно су описани и јасно представљени сви добијени резултати.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада. Коришћена **литература** садржи списак од 275 референци.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Хистопатолошком анализом третираног ткива је утврђено присуство запаљењског инфилтрата и некротичних ћелија у обе експерименталне групе. Активности креатин киназе и аспартат аминотрансферазе у серуму су биле значајно повишене у обе експерименталне групе у односу на одговарајућу контролну групу, али су вредности биле значајно више у присуству *IL-33/ST2* осовине. Волуменска густина запаљењског инфилтрата на месту акутног запаљења је била значајно виша у присуству *IL-33/ST2* осовине. Генска експресија цитокина *IL-33* и *ST2* рецептора је била значајно повећана на месту акутног запаљења. Генска експресија цитокина фактора некрозе тумора-алфа (*TNF-alfa*), интерлеукина-6 (*IL-6*), интерлеукина-12p35 (*IL-12p35*) је била значајно повећана на месту акутног запаљења у обе експерименталне групе, при чему *IL-33/ST2* осовина није имала утицај на генску експресију ових цитокина у акутном запаљењу. Генска експресија антиинфламаторног цитокина фактора трансформације раста-бета (*TGF-beta*) на месту акутног запаљења је била значајно већа код *ST2*^{-/-} мишева код којих је изазвано акутно запаљење него код генетски неизмењених мишева код којих је изазвано акутно запаљење. Концентрација гвожђа на месту акутног запаљења је била значајно повишена код генетски неизмењених животиња, односно у присуству *IL-33/ST2* осовине, док се није значајно мењала код *ST2*^{-/-} мишева. Супротно, просечна количина хемоглобина у еритроциту је била значајно нижа код генетски неизмењених мишева код којих је изазвано акутно запаљење у односу на контролну групу, док се није значајно мењала код *ST2*^{-/-} мишева у акутном запаљењу. Број еритроцита у крви и хематокрит су били повишени, док је проценат еритроцита у слезини био снижен у акутном запаљењу и код генетски неизмењених мишева и код *ST2*^{-/-} мишева. Број неутрофила у крви је био снижен код генетски неизмењених мишева у акутном запаљењу. Број лимфоцита у крви је био снижен у обе експерименталне групе у односу на одговарајућу контролну групу. Концентрација магнезијума у ткиву је била снижена код генетски неизмењених мишева код којих је изазвано акутно запаљење у односу на контролну групу, док се није значајно мењала код *ST2*^{-/-} мишева у акутном запаљењу. Додатно, концентрација магнезијума у упаљеном ткиву је била нижа у присуству *IL-33/ST2* осовине. Концентрација бакра, селена и мангана на месту акутног запаљења се није значајно мењала ни код генетски неизмењених мишева, ни код *ST2*^{-/-} мишева. Концентрација калијума на месту акутног запаљења је била снижена у обе експерименталне групе у односу на одговарајућу контролну групу, али је код генетски неизмењених мишева, код којих је изазвано акутно запаљење, та концентрација била значајно нижа у поређењу са одговарајућом групом *ST2*^{-/-} мишева. Фрактална димензија упаљеног ткива је била значајно нижа у обе

експерименталне групе у односу на одговарајуће контролне групе. Код генетски неизмењених мишева код којих је изазвано акутно запаљење вредности угаоног другог момента и текстуралне корелације упаљеног ткива су биле значајно ниже у односу на контролну групу, док се није значајно мењала код *ST2*^{-/-} мишева у акутном запаљењу. Додатно, угаони други момент и текстурална корелација упаљеног ткива су били значајно нижи код генетски неизмењених мишева код којих је изазвано акутно запаљење у односу на *ST2*^{-/-} мишеве код којих је изазвано акутно запаљење. И код генетски неизмењених мишева и код *ST2*^{-/-} мишева на месту акутног запаљења је дошло до пораста активности глутатион пероксидазе, односно смањења активности супероксид дизмутазе у односу на одговарајућу контролну групу. Садржај редукованог глутатиона на месту запаљења је значајно порастао код *ST2*^{-/-} мишева у акутном запаљењу и био је већи него у упаљеном ткиву генетски неизмењених мишева.

В) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

Интерлеукин-33 је једанаести цитокин у интерлеукин-1 породици цитокина и откривен је 2005. године као специфични лиганд за *ST2* рецептор (Schmitz и сар., 2005). Најпре је *IL-33/ST2* осовина повезивана са *Th2* ћелијским одговором (Schmitz и сар., 2005) и показано је да интерлеукин-33 и *ST2* рецептор имају улогу у патогенези астме, атопијског дерматитиса и алергијског коњуكتивитиса (Sjöberg и сар., 2015; Bartemes и Kita, 2012; Salimi и сар., 2013; Matsuda и сар., 2009). Међутим, *IL-33/ST2* осовина може имати улогу и у другим болестима и поремећајима - у реуматоидном артритису, системској склерози, карциному сквамозних ћелија, аутоимунском увеитису, атеросклерози и инфекцији гљивицом *Candida Albicans* (Verri и сар., 2010; Manetti и сар., 2010; Ishikawa и сар., 2014; Barbour и сар., 2014; McLaren и сар., 2010; Le и сар., 2012). У различитим поремећајима, *IL-33/ST2* осовина може имати про- и анти-запаљењску улогу. Акутно запаљење је готово тренутна, заштитна реакција ткива и његових крвних судова на оштећење (Mitchell и Cotran, 2003; Grossman и Porth, 2014). Међутим, запаљење може имати и штетне последице и довести до додатног оштећења ткива и ћелија, и различитих поремећаја у организму. Тачна улога *IL-33/ST2* осовине у патогенези акутног запаљења није у потпуности разјашњена.

IL-33/ST2 осовина доприноси развоју интензивније инфилтрације запаљењским ћелијама на месту акутног запаљења и већем оштећењу ткива и ћелија у акутном запаљењу (Stanković и сар., 2016а). Описано је да интрадермална инјекција интерлеукина-33 доводи до преласка леукоцита у ткиво, као и да је инфилтрација полиморфонуклеарним и мононуклеарним леукоцитима мања код *ST2*^{-/-} животиња код којих је изазван експериментални реуматоидни артритис (Hueber и сар., 2011; Xu и сар., 2008). Експресија интерлеукина-33 се повећава у кожи након механичког и хемијског оштећења, а већ повећана експресија гена *ST2* рецептора у измењеној кожи пацијената са атопијским дерматитисом се додатно повећава један дан након излагања стафилококном ентеротоксину Б (Savinko и сар., 2012). Резултати ове дисертације о повећању генске експресије интерлеукина-33 и *ST2* рецептора на месту акутног запаљења у обе експерименталне групе указују на значај *IL-33/ST2* осовине у акутном запаљењу (Stanković и сар., 2016а). На месту акутног запаљења генска експресија

интерлеукина-33 је била већа код *ST2*^{-/-} животиња, што је објашњено могућом позитивном повратном спрегом услед недостатка рецептора (Stankovic и сар., 2016а). У експерименталном моделу сепсе је уочено да је концентрација интерлеукина-33 виша код мишева којима је уклоњен ген за *ST2* рецептор него код генетски неизмењених мишева (Alves-Filho и сар., 2010). Генска експресија прозапаљењских цитокина и субјединице прозапаљењског цитокина, тј. фактора некрозе тумора-алфа, интерлеукина-6 и интерлеукина-12*p35* (Abbas и сар., 2010; Trinchieri, 1995) је била повећана у запаљењу, а *IL-33/ST2* осовина није утицала на промену експресије ових цитокина на месту запаљења (Stankovic и сар., 2016а). Генска експресија антизапаљењског цитокина *TGF-beta* на месту акутног запаљења је била значајно већа код *ST2*^{-/-} мишева, што може бити једно од објашњења за блаже акутно запаљење и мање оштећење ткива у одсуству *IL-33/ST2* осовине. Лечење анти- *IL-33* антителима повећава експресију *TGF-beta* у кичменој мождини у експерименталном моделу аутоимунског енцефаломијелитиса изазваном код мишева и доприноси развоју блаже клиничке слике (Li и сар., 2012). С тим у вези, резултати докторске дисертације указују да недостатак *IL-33/ST2* осовине доводи до веће генске експресије *TGF-beta* у упаљеном ткиву (Stankovic и сар., 2016а). На месту запаљења расте концентрација гвожђа (Van Snick и сар., 1974; Andersen и сар., 2014), а мање гвожђа је расположиво за синтезу хемоглобина (Nemeth и сар., 2004). У докторској дисертацији је први пут показано да заправо *IL-33/ST2* осовина има улогу у порасту концентрације гвожђа на месту акутног запаљења и снижавању просечне количине хемоглобина у еритроциту (Stankovic и сар., 2015). Број еритроцита у крви и хематокрит су били повишени, а проценат еритроцита у слезини снижен у обе запаљењске групе. У стресу и при ослобађању катехоламина повећава се број еритроцита у крви услед контракције слезине (Thornton и сар., 2001; Lai и сар., 2006). С обзиром да је запаљење стресно стање, резултати броја еритроцита у крви, хематокрита и процента еритроцита у слезини су у складу са подацима из литературе (Thornton и сар., 2001; Lai и сар., 2006). Број неутрофила у крви је био снижен код генетски неизмењених мишева у акутном запаљењу, а број лимфоцита у крви у обе експерименталне групе у односу на одговарајућу контролну групу, што је у складу са налазом да у запаљењу може доћи до пада броја леукоцита у крви услед масивне миграције у оштећено ткиво (Gaspard и Twite, 2005; Grossman и Porth, 2014). У стресном стању, као што је запаљење, смањује се концентрација магнезијума у ћелији (Pongratz и Straub, 2014; Seelig и Rosanoff, 2003; Arsenian, 1993), док је при недостатку магнезијума запаљењски одговор интензивнији (Mazur и сар., 2007). Ова обрнута повезаност између концентрације магнезијума и интензитета запаљења није у потпуности разјашњена, а резултати ове дисертације су по први пут показали да заправо *IL-33/ST2* осовина доприноси снижавању концентрације магнезијума на месту акутног запаљења (Stankovic и сар., 2016а). Бакар, селен и манган су антиоксидативни микроелементи (Gropper и Smith, 2013; Coassin и сар., 1992). Утицај *IL-33/ST2* осовине на промену концентрације ових елемената на месту акутног запаљења до сада није описан у литератури, а резултати ове дисертације указују да *IL-33/ST2* осовина не утиче на њихову концентрацију. С обзиром да се концентрација калијума у ткиву снижава у исхемијском оштећењу ткива, концентрација калијума у ткиву је потенцијални индикатор оштећења ткива (Mituhashi и сар., 2003).

Концентрација калијума у ткиву је била снижена у обе експерименталне групе, али је била додатно нижа у присуству *IL-33/ST2* осовине, што је у складу са другим показатељима оштећења ћелија и ткива представљеним у овој дисертацији. Фрактална и текстуална анализа су математичке методе које се могу користити и у биомедицинским истраживањима (Deu и Banik, 2012; Rajagopalan и сар., 2013; Blumenkrantz и сар., 2008; Yang и сар., 2012). Фрактална димензија је индикатор структуралне комплексности и показано је да се фракталне димензије ткива беле масе мозга у амиотрофичној латералној склерози и деменцији (Rajagopalan и сар., 2013), и плућа у старењу (Copley и сар., 2012) снижавају, што указује на губитак ткивне организације и комплексности. Слично овим резултатима, у дисертацији је одређивањем фракталне димензије показано да се смањује ткивна комплексност на месту акутног запаљења. Угаони други момент као показатељ униформности и хомогености (Sharma и сар., 2008; Naralick и сар., 1973) и текстуална корелација као показатељ постојања и јачине линеарне повезаности између парова резолуционих јединица микрографа (Stanković и сар., 2016b; Sharma и сар., 2008; Naralick и сар., 1973) су били нижи на месту акутног запаљења у присуству *IL-33/ST2* осовине, што указује да *IL-33/ST2* осовина доприноси смањењу ткивне униформности, хомогености и регуларности. Угаони други момент и текстуална корелација паротидне жлезде се снижавају након оштећења радијацијом (Yang и сар., 2012). Додатно, угаони други момент је предложен као параметар који се може користити у диференцијацији остеоартритичне од здраве хрскавице (Blumenkrantz и сар., 2008). У овој дисертацији се по први пут указује на могућност коришћења фракталне димензије, угаоног другог момента и текстуалне корелације као нових параметара за квантификацију структуралних промена у акутном запаљењу (Stanković и сар., 2016b). На месту акутног запаљења дошло је до пораста активности глутатион пероксидазе и смањења активности супероксид дизмутазе у обе експерименталне групе, што је у складу са резултатима из литературе (Li и Zhou, 2011; Ueda и сар., 2008; Chhetria и сар., 2011; Ismail и сар., 2012). Дејство *IL-33/ST2* осовине на активност ових ензима до сада није описан, а резултати дисертације указују да *IL-33/ST2* осовина не утиче на промену активности ових ензима у акутном запаљењу. У дисертацији др Марије Станковић је први пут показано да се у одсуству *IL-33/ST2* осовине повећава садржај антиоксиданта редукованог глутатиона (*GSH*) на месту акутног запаљења, што доводи до мањег оштећења ткива и развоја блажег запаљењског одговора у акутном запаљењу (Stanković и сар., 2016a).

Г) Објављени радови који чине део докторске дисертације

1. **Stankovic, M.S.**, Turuntas, V., De Luka, S.R., Jankovic, S., Stefanovic, S., Puskas, N., Zaletel, I., Milutinović-Smiljanic, S., Trbovich, A.M., 2015. Effects of IL-33/St2 pathway on alteration of iron and hematological parameters in acute inflammation. *Exp Mol Pathol.* 99, 687-692. (Раd у врхунском међународном часопису, **M21, IF 2,638**)

2. **Stankovic, M.S.**, Janjetovic, K., Velimirovic, M., Milenkovic, M., Stojkovic, T., Puskas, N., Zaletel, I., De Luka, S.R., Jankovic, S., Stefanovic, S., Japundzic-Zigon, N., Petronijevic, N.D., Trajkovic, V., Trbovich, A.M., 2016a. Effects of IL-33/ST2 pathway in acute inflammation on tissue damage, antioxidative parameters, magnesium concentration and cytokines profile. *Exp Mol Pathol.* 101, 31-37. (Раd у врхунском међународном часопису, **M21, IF 2,638**)

3. **Stankovic, M.**, Pantic, I., DE Luka, S.R., Puskas, N., Zaletel, I., Milutinovic-Smiljanic, S., Pantic. S., Trbovich, A.M., 2016b. Quantification of structural changes in acute inflammation by fractal dimension, angular second moment and correlation. *J Microsc.* 261, 277-284. (Раd у врхунском међународном часопису, **M21, IF 2,136**)

Д) Закључак (образложење научног доприноса)

Дисертација „**IL-33/ST2 осовина у експерименталном моделу акутног запаљења**“ др Марије Станковић представља оригинални научни допринос у разумевању улоге *IL-33/ST2* осовине у патогенези акутног запаљења. Резултати докторске дисертације по први пут указују да *IL-33/ST2* осовина доприноси интензивнијем запаљењу и оштећењу ткива у акутном запаљењу утичући на концентрацију магнезијума и гвожђа, садржај редукованог глутатиона и генску експресију *TGF-beta* на месту акутног запаљења. Могуће је да ће у будућности циљано утицање на *IL-33/ST2* осовину у акутном запаљењу унети новине у лечењу.

Пажљивом анализом докторске дисертације др Марије Станковић комисија је закључила да је ова дисертација урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви су прецизно дефинисани, научни приступ је оригиналан и пажљиво изабран, а методологија рада савремена. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног, а имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати дисертацију др Марије Станковић и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 05.07.2016. године

Чланови Комисије:

Ментор:

Проф. др Силвио Р. Де Лука

Проф. др Александар М. Трбовић

Проф. др Милош Марковић

Доц. др Биљана Драшковић Павловић
