

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-2508/3-1 од 06.04.2011 године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Слађане Павловић** под називом:

"Имуномодулаторни ефекти интравенских имуноглобулина у diabetes mellitus – у тип 1:

(анализа у експерименталном моделу индукованог дијабетеса код мишева)"

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

1. Проф. др Миодраг Лукић, председник, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
3. Станислава Стошић-Грујичић, члан, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду,

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Слађана Павловић**, 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

Слађана Павловић је рођена 11.08.1976. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу са одличним успехом. Медицински факултет у Крагујевцу, уписала је школске 1995/96. године, а дипломирала 11. јула 2001. године са просечном оценом 9,51 и тиме стекла звање доктора медицине. Обавила је општи лекарски стаж и положила стручни испит.

Октобра 2001. године изабрана је за асистента приправника на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Септембра 2010. године изабрана је за асистента на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу

Магистарске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је школске 2001/2002. године и положила све испите у првој години са оценом 10 (десет). Специјалистички испит из офталмологије положила је у јулу 2007. на Медицинском факултету у Универзитета у Нишу са оценом 5 (пет). У октобру 2007. године уписала је другу годину Академских докторских студија на Медицинском факултету у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Усмени докторски испит положила је 16.07.2008. године са оценом 10 (десет). У школској 2008/2009. години уписала је специјалистичке студије из Имунологије на Медицинском факултету у Универзитета у Крагујевцу. Члан је Друштва имунолога Србије.

Б. Научно истраживачки рад

Још у току редовних студија кандидат Слађана Павловић је учествовала у научно-истраживачком раду. Од 2001. године активно се бавим научно-истраживачким радом у лабораторији за клиничку и експерименталну имунологију, Центра за Молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Медицинског факултета у Крагујевцу. Континуирани рад огледа се и у учешћу на Јуниор пројектима Медицинског факултета у Крагујевцу и пројектима финансираним од Министарства науке Србије.

1. Имуномодулација хроничних инфламаторних болести, ЈП 2/09
2. Улога регулаторних Т лимфоцита и Th2 посредоване имунорегулације у дијабетесу индукованом малим поновљеним дозама стрептозотоцина ЈП 08/10.
3. Молекулске детерминанте урођене имуности у аутоимунским болестима и канцерогенези ON175069.

В. Подаци о објављеним радовима

Кандидат Слађана Павловић остварила је 35 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- пет радова у целини публикованих у научним часописима међународног значаја; један M21; два M22; два M23
- три рада у целини публикована у националним часописима; M52
- већи број сажетака на међународним (5 абстракта M34) и домаћим научним скуповима (11 абстракта M64)

Од поменутих радова за извештај су релевантни:

1. **Pavlovic S**, Zdravkovic N, Dimitrov JD, Djukic A, Arsenijevic N, Vassilev TL, Lukic ML. Intravenous immunoglobulins exposed to heme (heme IVIG) are more efficient than IVIG in attenuating autoimmune diabetes. Clin Immunol. 2011;138(2):162-71
M21-8 бодова
2. Ravić-Nikolić A, Radosavljević G, Jovanović I, Zdravković N, Mitrović S, **Pavlović S**, Arsenijević N. Systemic photochemotherapy decreases the expression of IFN- γ , IL-12p40 and IL-23p19 in psoriatic plaques. Eur J Dermatol. 2011 Jan-Feb;21(1):53-7
M22-5 бодова
3. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, **Pajovic S**, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. Autoimmunity. 2010 Jun;43(4):255-63. **M22-5 бодова**
4. Radosavljevic G, Ljubic 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):135-44. **M23-3 бода**
5. Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, **Pavlovic S**, Zdravkovic N, Milovanovic M, Acimovic Lj, Knezevic M, Bankovic D, Zdravkovic D and Arsenijevic N. Elevated Serum Level of IL-23 Correlates with Expression of VEGF in Human Colorectal Carcinoma. Archives of Medical Research 2010; 41(3):182-9. **M23-3 бода**

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

"Имуномодулаторни ефекти интравенских имуноглобулина у *diabetes mellitus* – у тип 1:

(анализа у експерименталном моделу индукованог дијабетеса код мишева)"

Предмет:

Diabetes mellitus тип 1 је хронично инфламаторно обољење које карактерише прогресивна деструкција панкреасних β ћелија Langerhans-ових острваца узрокована аутоимунским процесима. Превенција *diabetes mellitus*-а подразумева рано спречавање развоја ових аутоимунских процеса за које се сматра да су резултат поремећаја имунорегулације. Овај поремећај регулације омогућава Th1/Th17 лимфоцитима да покрену каскаду имунских/инфламаторних процеса у панкреасним острвцима који узрокују β ћелијску деструкцију. И нумеричка и функционална равнотежа између Th1/Th17 и регулаторних Т лимфоцита у панкреасним инфилтратима одређују обим разарања β ћелија. Тип и интензитет инфламације зависи од доминантности цитокинског профила, док Th1 и Th17 промовишу, Th2 и Treg одлажу инфламацију.

Интравенски имуноглобулини (Iv.Igs) су терапијски производи крви који поседују бројне имуномодулаторне и антиинфламаторне особине. Изворно коришћени у терапији примарних и секундарних имунодефицијенција, интравенски имуноглобулини се данас користе за третман различитих системских и аутоимунских обољења. Начин дејства Iv.Igs је комплексан и обухвата многе механизме међу којима је и могућност Iv.Igs да инхибирају функцију аутореактивних Т лимфоцита и смање продукцију проинфламаторних цитокина као што су TNF- α , IFN- γ и IL-17, а повећају продукцију IL10. На моделу експерименталног енцефаломијелитиса показано је да је Iv.Igs посредована заштита посредована CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регулаторним Т ћелијама (Treg). Недавно је показано да излагање IgG молекула *in vitro* реактивним молекулима ослобођеним на месту запаљења (ROS, јони гвожђа, хем, итд) резултира повећањем везивања IgG за стране и за сопствене антигене (укључујући и про-инфламаторне цитокине). Утврђено је да је ово повећање реактивности резултат побољшане улоге хидрофобних ефеката у њиховој интеракцији и повећане флексибилности паратопа. Терапијски ефекат имуноглобулина у мишићем моделу *diabetes mellitus*-а изазваним малим, поновљеним дозама стрептозотоцина (MLD-STZ) још увек није испитиван.

Хипотеза:

- Интравенски имуноглобулини модификују имунски одговор код diabetes mellitus-a и утичу на развој и сам ток болести

2.3. Подобност кандидата

Кандидат Слађана Павловић положила је усмени докторски испит 16.07.2008. године са оценом 10 (десет). У току студија објавила је шест радова у научним часописима међународног значаја и три рада у националним часописима, од чега један у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Плазма а самим тим и фракција плазме која се састоји од хладног етанола, а садржи део обогашен гамаглобулином, коришћени су пре више од 40-50 година као пасивна имунотерапија за лечење и заштиту од инфективних патогена. Циљ замене имуноглобулина код пацијената са примарном имунодефицијенцијом био је да се обезбеде адекватна антитела која ће спречити инфекције и дугорочне компликације, а нарочито пулмолошке болести. Овај интрамускуларни серумски глобулин био је примарна форма терапије до 1981, када је постала доступна интравенска форма имуноглобулина (Iv.Igs). Затим је запажено да се тромбоцитопенија смањивала при третирању имунодефицијентних пацијената Iv.Igs-има. Ово запажање довело је до употребе Iv.Igs-a код пацијената са идиопатском тромбоцитопенијском пурпуром, и наглог повећања употребе Iv.Igs-a као имуномодулаторне терапије код низа аутоимунских болести.

Бројне хипотезе су развијене да би се објаснила активност високодозног IgG-a. Постоје модели код којих се активност имуноглобулина повезују са поликлонским специфичним везивањем, које се односи на варијабилне домене антитела. Ови модели указују да имуноглобулини своју активност спроводе неутрализацијом активности аутоантитела и инфламаторних медијатора. Друга могућност је да је Fc IgG-a анти-инфламаторна компонента, што су подржавале ране клиничке студије у којима су препарати Fc фрагмента нормализовали ниво тромбоцита код аутоимунске тромбоцитопеније. Различити механизми су објашњавали дејство Fc фрагмената антитела, укључујући конкуренцију за ћелијски FcγR, сатурацију FcRn и модулацију инхибиторних путева.

Заправо, резултати указују да је деловање Iv.Igs комплексно и укључује неколико механизма који делују у синергији, као што су модулација Fc рецептора,

интерференција са комплементом и цитокинском мрежом, цитолиза циљних ћелија преко комплемента или преко цитотоксичности која је посредована антителима (ADCC), индукција апоптозе циљних ћелија, блокада костимулаторних молекула, интеракције са анти-идиотипском мрежом, неутрализација патогених антитела и модулација активације и диференцијације Т, Б ћелија и дендритских ћелија (DC).

Фракција имуноглобулина добијена од здравих особа повећава разноликост њиховог репертоара препознавања антигена након *in vitro* контакта са агресивним редокс агенсима који се ослобађају на местима запаљења. Добијени резултати показују да повећано везивање антигена било да се посматра различити интензитет или различити образац везивања зависи од хемијског агенса који се користи. Молекуларни механизми одговорни за побољшано препознавање структурно неповезаних антигена су, међутим, идентични. Излагање IgG молекула *in vitro* реактивним молекулима ослобођеним на месту запаљења (ROS, јони гвожђа, хем, итд) резултира повећањем везивања IgG за стране и за сопствене антигене. Утврђено је да је ово повећање реактивности резултат побољшане улоге хидрофобних ефеката у њиховој интеракцији и повећане флексибилности паратопа. Коришћено је неколико модела сепсе код мишева-сепса изазвана убризгавањем стандардизованог бактеријског липополисахарида, живе бактерије (*E.coli* strain WF+), или лигатуре и пунктата цекума. Испитиван је терапијски потенцијал модификованих имуноглобулина у горе описаним стањима сепсе код експерименталних животиња. Администрација модификованих имуноглобулина штити животиње од неконтролисане системске инфламаторне реакције, од мултипле органске дисфункције и од смрти.

Тип 1 дијабетеса је ткивно специфична аутоимунска болест у којој запаљење игра централну улогу. Уништавање β ћелија је последица апоптозе у процесу који захтева CD4 и CD8 Т лимфоците. Верује се да је присутна комплексна интеракција између ћелија које презентују антигене (дендритичне ћелије, макрофаге, Б ћелије), Т ћелија и бројних цитокина, који изазивају уништавање β ћелија. Студије говоре у прилог томе да је важна улога проинфламаторних цитокина, укључујући TNF-α, IL-1, IL-6, IL-17 и IFN-γ, као и интеракције Fas-FasL, перфорина, гранзима и азот монооксида. Упркос постојању многих студија које описују укљученост многих од ових молекула, још увек су спорна мишљења у којој мери сваки од њих учествује у деструкцији β ћелија. У складу са претпоставком да код дијабетеса тип 1 доминирају Th1 ћелије, је и запажање да већина аутореактивних колонова Т ћелија производи цитокински профил повезан са Th1 (којим доминира интерферон-гама). Померање цитокинског профила

аутореактивних Т ћелија од инфламаторни Th1 ка наводно бенигном-типу Th2 је у многим случајевима у вези са заштитом од дијабетеса у NOD мишева као и другим Т-ћелијски-посредованим аутоимунским болестима. Постоје бројни докази који указују на то да су аутореактивне Т ћелије присутне у нормалном имунском ситему али је њихов аутореактивни потенцијал спречен путем других регулаторних (супресивних) Т ћелија. Механизам преко којег регулаторне Т ћелије функционишу *in vivo* и тако блокирају развој дијабетеса типа 1 се интензивно истражује. Treg ћелије присутне у перипанкреатичним лимфним чворовима регулишу развој аутореактивних Т ћелија ограничавајући њихову експанзију и диференцијацију. Занимљиво, Treg ћелије могу да функционишу на принципу прекида развоја ефекторних Т ћелија кроз ограничавање приступа аутореактивних Т ћелија дендритским ћелијама. Захваљујући контроли над овим кључним кораком у лимфном чвору, Treg ћелије лимитирају могућност да Т ћелија постане ефекторска ћелија. Treg ћелије инхибирају експресију СХС-хемокинског рецептора 3 (CXCR3) на Т ћелијама са консеквентним губитком инфилтрације панкреасних острваца овим ћелијама. Такође оне могу директно спречити аутоимунску агресију у острвцима контролишући инфламаторну реакцију (инсулитис). T_H1 ћелије производе IL-10 и TGF- β , који имају важну имунорегулаторну улогу у дијабетесу тип 1. Транзиторна експресија TGF- β у острвцима током иницијалне фазе дијабетеса инхибира настанак болести и стимулише експанзију или генерисање унутар острвца Foxp3 Treg ћелије. IL-10 модулише функције антиген презентујућих ћелија, редукује инфламацију и смањује Т-ћелијску активацију. Осим тога, IL-10 који производе T_H1 ћелије нисходно регулише експресију интрацелуларног адхезивног молекула 1 (ICAM1) на ефекторским Т ћелијама, што спречава њихову миграцију у циљне органе.

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

Циљ ове студије је да се испита утицај и могући механизми дејства Iv.Igs на развој diabetes mellitus–а тип 1.

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

- Показати да Iv.Igs узрокују каснију појаву хипергликемије код мишева или уопште не доводе до појаве хипергликемије
- Показати да Iv.Igs узрокују каснију појаву гликозурије код мишева или уопште не доводе до појаве гликозурије
- Показати да Iv.Igs модификују продукцију проинфламаторних цитокина

- Показати да Iv.Igs модификују целуларни инфилтрат у Langerhans-овим острвцима и регионалним панкреатичним лимфним чворовима након индукције дијабета код мишева
- Показати да Iv.Igs утичу на број и функцију Treg лимфоцита након индукције дијабета код мишева
- Показати да HSA и хематин, након индукције дијабетеса код мишева, не утичу битно на развој и сам ток болести
- Показати да Iv.Igs модификовани хемом имају јаче терапијске ефекте од природних Iv.Igs.
- Проверити да ли веће дозе (600 mg/ml) Iv.Igs даје статистичку разлику у дејству природних и Iv.Igs изложених хему.
- Урадити површинско бојење са F4/80 утврдити укупан број макрофага у панкреасу и лимфним чворовима. Затим урадити интрацелуларно бојење цитокина и утврдити који проценат продукује IL-12, а који IL-10, односно утврдити проценат M1 и M2 макрофага. Такође урадити површинско бојење за CD206 и CD273 и утврдити проценат M2 макрофага.

Ово истраживање нам може дати нове податке о улози интравенских имуноглобулина на развој diabetes mellitus-a, као и учинак у модулацији имунског одговора у експерименталном моделу дијабетеса код мишева.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У досада објављеној и доступној литератури Iv.Igs су коришћени у терапији примарних и секундарних имунодефицијенција, као и у третману различитих системских и аутоимунских обољења. Предложено је неколико механизма да би се објаснили благотворни ефекти Iv.Igs код болесника. У последње време, показано је да је антиинфламаторна активност Iv.Igs посредована углавном фракцијом антитела које садржи α 2,6-сијалинску киселину терминално везану са Asn297 повезаним гликаном на Fc региону. Такође се зна да SIGN-R1, C-тип лектински рецептор на макрофагама слезине миша, препознаје и посредује у антиинфламаторним ефектима сијалинизованог Fc фрагмента IgG. Сијалинизовани Fc фрагмент IgG се такође везује за DC-SIGN, људски облик SIGNR1 рецептор. Међутим, важно је напоменути да се DC-SIGN и SIGNR1 знатно разликују у ткивној дистрибуцији. Пошто DC-SIGN је посебно

експримиран на хуманим DC, испитивано је да ли је интеракција DC-SIGN и α 2,6-сијалинизирани Fc неопходна за антиинфламаторни ефекат Iv.Igs код хуманих DC.

Занимљиво је да су они показали да интеракција DC-SIGN и α 2,6 сијалинизираног Fc фрагмента IgG није обавезна за антиинфламаторну активност Iv.Igs хуманих DC. Они су такође показали да Iv.Igs интерагују и са CD40 на DC. Стога, треба бити опрезан при превођењу резултата са мишијих модела на пацијенте.

Недавно је показано да је Iv.Igs посредована заштита у моделу експерименталног енцефаломијелитиса посредована CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регулаторним Т ћелијама (Treg). Показано је да третман Iv.Igs који су излагани ниским вредностима рН побољшава преживљавање мишева са бактеријским липополисахарид-индукованим септичким шоком. Терапијски ефекат имуноглобулина у мишјем моделу diabetes mellitus–а изазваним малим, поновљеним дозама стрептозотоцина (MLD–STZ) још увек није испитиван.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње: У експериментима ће се користити 8 – 10 недеља стари C57BL/6 мужјаци.

Индукција дијабетеса: Мишеви ће 5 узастопних дана примати интраперитонеално инјекцију стрептозотоцина у дози 40 mg/kg раствореног у цитратном пуферу (рН 4.48).

Интравенски имуноглобулини: Од првог дана експеримента мишеви ће добијати свакодневно субкутано инјекцију интравенских имуноглобулина у дози 50 mg/kg, 200 mg/kg и 600 mg/kg 15 дана. Користићемо три врсте Iv.Igs (природне Iv.Igs conc. 50 mg/ml, Iv.Igs изложене хему conc. 50 mg/ml, Iv.Igs изложене Fe (II) conc. 11mg/ml).

Примена циклофосфамида: Мишеви ће примати циклофосфамид (175 mg/kg), петог и седмог дана од почетка експеримента.

Примена хуманог серум албумина: Контролне животиње ће примати хумани серум албумин у дози 50 mg/kg, 200 mg/kg и 600 mg/kg субкутано, 15 дана.

Примена хематина: Растворити хемин (Fe (II) протопорфирин) у 0.1M раствору NaOH до финалне концентрације 2.5 mM. Познато је да хемин у базној средини прелази у хематин. Истовремено се раствори HSA у физиолошком раствору до финалне концентрације 50 mg/ml. Да би се добила адекватна контрола Iv.Igs модификованих хемом помеша се 800 μ l 2.5 mM хемина са 100 ml HSA у физиолошком раствору (conc. 50 mg/ml). Друга група контролних животиња ће се третирати дневно са 10 μ l/g добијеног раствора.

Одређивање гликемије и гликозурије: Ниво глукозе (Abbott Exccide) ће се свакодневно мерити у крви добијеној из репне вене мишева након гладовања од 4h. Ниво глукозе из мокраће мишева ће се свакодневно утврђивати test trakom Uroscan 2. Гликолизиран хемоглобин (HbA1c) (Olympus, Center Valley, Pennsylvania) у крви биће мерен на дан жртвовања мишева.

Хистолошка анализа инфилтришућих ћелија: Мишеве ћемо жртвовати у етру након чега ће им се водити панкераси и панкреатични лимфни чворови од којих ће се направити парафински исечци. Исечци, дебљине 4-5 μ m, ће се добијати коришћењем микротоме, а затим ће се бојити хематоксилином и еозином (H&E). Обојени препарати служиће за бројање лимфоцитних инфилтрата у Лангерхансовим острвцима панкреаса светлосним микроскопом користећи објектив са увеличањем 40 X (14).

ELISA: Мишеви се жртвују у етру, након чега им се издваја крв из абдоминалне аорте и центрифугира 10 мин на 3000 об. Серум се одваја из крви и одлаже у замрзивач на -20°C до анализе. Мерићемо серумски ниво четири цитокина: IFN- γ , TNF, IL-17, IL-10 коришћењем ензимоимунотеста (ELISA) кита (R&D Systems Minneapolis, MN) специфичног за мишје цитокине, уз сагласност са написаним протоколом. Стандарди за одређене цитокине се растварају у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације за IFN- γ , TNF, IL-10 буду 2000 pg/ml, а за IL-17 1000 pg/ml. Затим се направи серија од седам двоструких разблажења почетних концентрација стандарда у Reagent Diluent-у, да би се формирала стандардна крива. Разблажено Capture Antibody (100 μ l) се сипа у бунаре микротитар плоче и инкубира преко ноћи на собној температури, након чега се испира у Wash Buffer-у. Испитивани серуми се разблаже четири пута (1:4) у Reagent Diluent-у. Одговарајућа разблажења стандарда (100 μ l) и испитиваних серума (100 μ l) сипају се у опране бунаре обележене Capture Antibody и инкубирају 2 сата на собној температури. Након завршене инкубације и испирања у сваки бунар се додаје Detection Antibody (100 μ l) и оставља да се инкубира 2 сата на собној температури. По завршеној инкубацији и испирању у све бунаре се сипа Streptavidin-HRP (100 μ l) и остави да се инкубира (без дирекног излагања сунчевој светлости) 20 мин. на собној температури. Након тога следи поновно испирање и додавање Substrate Solution (100 μ l), затим Stop Solution (50 μ l). Резултати се читавају ELISA читачем на 450 nm таласне дужине.

FACS: Након жртвовања издвојити парпанкреатичне лимфне чворове и панкреас из сваког миша, пуловати по групама и ставити у 10 ml раствора (RPMI 1640, 5% говеђег феталног серума). Пола милиона изолованих ћелија се оперу и ресуспендују у хладном PBS-у. Пипетом ставити одговарајуће количине CD4 за површинско бојење на дно

сваке од епрувете (12 x 75 мм). Додати 100 μ l ћелија по епрувети и добро измешати. Инкубирати 20 минута у мраку на собној температури. За прање ћелија, додати 2 ml BD Pharmingen™ Stain Buffer-a (FBS), у сваку епрувету. Центрифугирати 250 x g 10 минута, а затим уклонити пуфер. За фиксацију ћелија, нежно ресуспендовати пелет у заосталом волумену staining buffer-a, а затим додати 2 ml свеже припремљеног хладног BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Fixation Buffer-a . Промућкати добро и инкубирати 30 минута, на 4°C у мраку. Центрифугирати 5 минута (500xg) и уклонити фиксатив. Ресуспендовати пелет у 2 ml свеже припремљен претходно загрејан BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Permeabilization buffer-a. Центрифугирати 5 минута (500x g). Уклонити пермеабилizacionи раствор. Поново ресуспендовати пелет у 2 ml свеже припремљеног претходно загрејаног BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Permeabilization buffer-a. Инкубирати 30 минута на 37°C у мраку. Центрифугирати 5 минута (500xg), и уклонити пуфер. За прање ћелија, додати 2 ml BD Pharmingen™ Stain Buffer-a(FBS) у сваку епрувету и центрифугирати 5 минута (500x g). Додајте 20 μ l коњугованих Foxp3 антитела разређених са BD Pharmingen™ Stain Buffer-ом (FBS) у одговарајућим концентрацијама. Нежно промешати на шејкеру или кратко вортексовати. Инкубирати 20 минута у мраку. Поновити корак прања два пута. Ресуспендовати ћелије у 0,5 ml Pharmingen™ Stain Buffer (FBS) и анализирати одмах.

Поступак за површинско и интрацелуларно бојење:

Стимулација ћелија: Стимулисати ћелије (1×10^6 /ml) са 5 μ l PMA, 5 μ l јономицина и 0,7 μ l Golgy stop раствора. Инкубирати ћелије 4h на 37°C, 5% CO₂. Центрифугирати на 1500 обртаја 5 мин.

Површинско бојење ћелијских антигена: Ставити 10^6 ћелија у 50 μ l Staining пуфера са одговарајућом количином моноклонских антитела (30 минута, 4° C). Опрати ћелије 2 пута у Staining пуферу (1 мл/епрувети). Центрифугирати на 1500 обртаја 5 мин. Ресуспендовати ћелије у 250 μ l по епрувети Fixation/Permeabilization раствора 20 минута на 4°C. Вортексовати. Опрати ћелије 2 пута у BD Perm/Wash™ пуферу (1 мл/епрувети). Ресуспендовати ћелије у 50 μ l BD Perm/Wash™ пуферу. Додати анти-цитокинских антитела или одговарајуће негативне контроле. Инкубирати 4°C 30 минута у мраку. Вортексовати. Опрати ћелије 2 пута у BD Perm/Wash™ пуфером (1 ml/епрувети) и ресуспендовати у 300 Staining Buffer пре FACS анализе.

Снага студије и величина узорка

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима гликемије и гликозурије, серумске концентрације IFN- γ , TNF, IL-17 и IL-10, Treg односно процента мононуклеарних ћелија у лимфном чвору које продукују ове цитокине, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 50 за сваку од група. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

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 девијација (SD). 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

Показано је да третман Iv.Igs повољно утиче на ток бројних аутоимунских болести било да су оне посредоване аутоантителима било аутореактивним Т лимфоцитима. Терапијски потенцијал модификованих имуноглобулина се испитивао у стањима сепсе код експерименталних животиња. Администрација модификованих имуноглобулина штити животиње од неконтролисане системске инфламаторне реакције, од мултипле органске дисфункције и од смрти. Показано је да третман Iv.Igs који су излагани ниским вредностима рН побољшава преживљавање мишева са бактеријским липополисахарид-индукованим септичким шоком. У овој студији ми желимо да по

први пут покажемо да Iv.Igs (природни и модификовани) одлажу појаву болести у MLD-STZ моделу дијабетеса типа 1. Очекујемо да ће третман Iv.Igs, посебно Iv.Igs модификованих хемом, значајно допринети снижавању вредности шећера и вредности HbA1c у крви као и снижавању или спречавању појаве гликозурије код мишева. Такође се очекује да ће Iv.Igs модификовати лимфоцитни инфилтрат у панкреасу и панкреатичним лимфним чворовима након индукције дијабетеса код мишева. Третирање мишева са HSA и хематином, након индукције дијабетеса код мишева, вероватно неће битно да утиче на развој и сам ток болести. Скорије студије показују да је Th1 популација кључни медијатор β ћелијске аутореактивности, док Th2 популацију карактерише протективни ефекат. У скорије време је такође показано да Th17 играју важну улогу у настанку diabetes mellitus-a. Због тога је значајно испитати нивое појединих цитокина TNF, IFN- γ , IL-17. Главни механизам антиинфламаторног ефекта Iv.Igs је модулација продукције цитокина и цитокинских антагониста. Очекујемо смањење проинфламаторних цитокина и повећање нивоа IL-10 након Iv.Igs третмана. У последње време све више се говори о значају Treg лимфоцита у контроли diabetes mellitus-a. Иако је механизам интеракције Iv.Igs-T лимфоцита комплексан и недовољно разјашњен ми очекујемо да ће Iv.Igs-посредована заштита од развоја болести бити повезана са повећањем Treg лимфоцита. На основу добијених резултата ове експерименталне студије моћи ћемо боље да сагледамо утицај интравенских имуноглобулина на патогенезу дијабетеса тип 1.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи комплементарне експерименталне приступе *in vivo* и *in vitro*, *wildtype* мишеве биће испитана улога Iv.Igs у настанку и развоју diabetes mellitus-a у експерименталном мишијем моделу.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **проф. др Миодрага Лукића**, професора емеритуса Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија. 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.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, 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. Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, члан

Закључак и предлог Комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Слађана Павловић 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. Слађане Павловић показати да интравенски имуноглобулини играју важну улогу у сузбијању развоја *diabetes mellitus*-а, чинећи их потенцијалним избором у експерименталној терапији дијабетеса;
4. Комисија предлаже Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Слађане Павловић, под називом **"Имуномодулаторни ефекти интравенских имуноглобулина у *diabetes mellitus*–у тип 1: (анализа у експерименталном моделу индукованог дијабетеса код мишева)"** и одобри њену израду.

У Крагујевцу

13.04.2011.г

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, председник, професор емеритус Универзитета 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. **Станислава Стошић-Грујичић**, члан научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду,
-