

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-10274/3-9 од 28.11.2012. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Николе Сладојевић, под називом:

„Утицај малих доза спиринолактона на инфламаторни одговор проузрокован реперфузијом možданог ткива у експерименталном мишјем моделу исхемичног možданог удара.”

На основу одлуке Већа, предложена Комисија у саставу:

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Гордана Тончев**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неурологија
3. **Проф. др Александар Рашковић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета у Новом Саду, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

подноси Наставно-научном већу Факултета следећи

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија

Никола Сладојевић је рођен 4. октобра 1980. године у Нишу. Медицински факултет Универзитета у Нишу завршио је 2007. године са просечном оценом 9,1. Дипломирао је на тему "Избор методе лечења терминалне уремије: хемодијализа, перитонеумска дијализа и трансплантација бубрега ". Током студија радио је као стручни сарадник на предмету Молекуларна и хумана генетика. У марту 2008. године завршио је Школу резервних официра санитетске службе Министарства одбране у Београду стекавши чин потпоручника. Прва научна искуства стиче 2008. године боравећи на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду под менторством професора Миодрага Чолића. У децембру 2009. године одлази на постдокторски истраживачки тренинг на одсеку за неуропатологију Медицинског факултета Универзитета у Мичигену у Ен Арбору (Ann Arbor), Сједињене Америчке Државе. На истом факултету и данас ради у лабораторији којом руководи професор Анушка Анђелковић-Zochowska. Течно говори енглески језик, ожењен је и отац је једног дечака.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Утицај малих доза спиринолактона на инфламаторни одговор проузрокован реперфузијом можданог ткива у експерименталном мишјем моделу исхемичног можданог удара.

Предмет: Праћење инфламаторног одговора након третмана малим дозама спиринолактона мишјих ендотелних ћелија мозга код *in vitro* модела исхемије-реперфузије као и ткива мозга након *in vivo* мишјег модела можданог удара.

Хипотеза: Употреба малих доза спиринолактона након реперфузије исхемичног можданог удара доводи до смањења инфламаторног одговора ткива мозга, а последично и до смањења величине инфаркта, едема, смртности, блажих неуролошких оштећења и бржег опоравка код C5BL6 мишева.

2.3. Подобност кандидата

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. **Nikola Sladojević**, Marinela Knežević, Jelena Jović, Vidojko Đorđević. Sindrom nemirnih nogu kod pacijenata na hemodijalizi: učestalost, težina i faktori rizika. *Medicinski časopis* 2012;46(3):138-144. doi:10.5937/mckg46-2330. M53, 1 бод.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

За сада једини одобрени метод лечења можданог удара је фибринолитичка терапија употребом рекомбинантног ткивног активатора плазминогена (rt-PA). Предности ове тераписке методе су потврђене у неколико великих студија: ATLANTIS, ECASS 2, ECASS 3 и NINDS. Главни недостаци ове методе су кратак прозор деловања од само три сата, реперфузионо оштећење узроковано инфламацијом, едем и хеморагија. У основи свих компликација тромболитичке терапије налази се инфламација као основни супстрат. И поред уложеног труда и средстава за сада још не постоји адекватна и безбедна антиинфламаторна и неуропротективна терапија која би се користила за смањење ризика од реперфузионог оштећења. У последње време све веће интересовање влада за дејство инхибитора минералокортикоидних рецептора на цереброваскуларне болести. Поред већ познатих тераписких ефеката код хипертензије, хипералдостеронизма и едематозних стања, њихов повољан утицај, доказан у неколико студија, отвара могућност за коришћење спиринолактона за смањење оштећења ткива након реперфузије крвног суда помоћу rt-PA. Спиринолактон је показао антиинфламаторни и антифиброзни ефекат у терапији стања након инфаркта миокарда, акутне бубрежне инсуфицијенције, хипертензивне дијабетичне нефропатије као и код артритиса. Резултати двеју опсежних студија (EPHESUS, RALES) показали су да мале дозе спиринолактона значајно редукују морбидитет и морталитет код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом индукујући регресију хипертрофије леве срчане коморе, добру контролу крвног притиска и превенцију нових кардиоваскуларних оштећења. У експерименталним студијама показао се веома корисним у превенцији можданог удара код спонтано хипертензивних пацова као и смањење величине инфаркта мозга код мишева са идукованим можданим ударом. Недостатак минералокортикоидног рецептора на макрофазима доводи до смањења постисхемичког инфламаторног одговора као и смањења величине инфаркта мозга након можданог удара.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Мождани удар представља један од највећих социоекономских проблема и свако унапређење терапије имало би велики друштвени значај. За сада једини одобрени метод лечења можданог удара је фибринолитичка терапија употребом рекомбинантног ткивног активатора плазминогена. Међутим и ако реканализација запушеног крвног суда представља логичан приступ лечењу исхемичног можданог удара она са собом носи велике ризике. Постоји велики број података који показују да употребом тромболитичке терапије и нагле реканализације крвног суда може доћи до јаке инфламаторне реакције и накнадног оштећења можданог ткива. Развој инфламације и додатно накупљање леукоцита у захваћеном подручју доводи до реоклузије малих крвних судова, ослобађања кисеоничних слободних радикала као и других ефекторних молекула продубљујући оштећење изазвано исхемијом које доводи до отварања крвномождане баријере, развоја едема, хеморагије и додатног оштећења можданог ткива. И поред тога што је велики број научника укључен на проналажењу адекватне антиинфламаторне и неуропротективне терапије за реперфузионо оштећење није начињен значајан корак у овој области. На основу досадашњих резултата за употребу спиринолактона као антиинфламаторне терапије након реперфузије мозга постоји све веће интересовање. Спиринолактон је лек који је добро познат клиничкој пракси и већ годинама се безбедно користи у лечењу разних поремећаја. Опсежна анализа повољног антиинфламаторног дејства спиринолактона након реперфузионог оштећења мозга и дефинисање молекуларног механизма антиинфламаторног дејства на ендотелним ћелијама мозга уз досадашње податке бацило би једно ново светло на могућност примене малих доза спиринолатона у терапији реперфузионог оштећења након можданог удара као и других инфламаторних стања ендотела.

Циљеви и хипотезе студије

Основни циљ овог научног рада су да се уради темељна студија и испита утицај малих доза спиринолактона на инфламаторни одговор ткива мозга након реперфузије код мишјег модела исхемичног можданог удара. Проценили бисмо разлике у величини инфаркта мозга, преживљавању, неуролошком оштећењу и брзини опоравка C5BL6 мишева изложених исхемично реперфузионом оштећењу мозга након примене малих доза спиринолактона. Пошто се ендотелне ћелије мозга налазе у епицентру инфламаторног одговора на исхемију-реперфузију и престављају последњи стуб одбране од реперфузионог оштећења, испитаћемо разлику у инфламаторном фенотипу мишијих ендотелних ћелија мозга изложених исхемији и реперфузији након третмана малом дозом спиринолактона као и молекуларни механизам антиинфламаторног дејства спиринолактона на мишје ендотелне ћелије мозга. Главне хипотезе којима ћемо се водити током ове студије су да употреба малих доза спиринолактона након реперфузије исхемичног можданог удара доводи до смањења инфламаторног одговора мозга, а последично и до смањења величине инфаркта, едема, смртности, блажих неуролошких оштећења и бржег опоравка код C5BL6 мишева као и да је молекуларни механизам антиинфламаторног дејства спиринолактона на ендотелне ћелије мозга након исхемично-реперфузионог оштећења посредован стабилизацијом NF-κB-IκBα комплекса чиме се онемогућава релокализација транскрипционог фактора NF-κB у једро и истовремено блокира његов транскрипциони потенцијал.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Спиринолактон је показао потенцијални антиинфламаторни и антифиброзни ефекату више досадашњих студија. Клиничке студије и експерименталне студије на животињама за сада су показале значајне бенефите након употребе спиринолактона код инфламаторних стања. Повољан ефекат уочен је код терапије стања након инфаркта миокарда, акутне бубрежне инсуфицијенције, хипертензивне дијабетичне нефропатије као и код артритиса. Резултати двеју опсежних студија (EPHESUS, RALES) показали су да мале дозе спиринолактона значајно редукују морбидитет и морталитет код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом индукујући регресију хипертрофије леве срчане коморе, добру контролу крвног притиска и превенцију нових кардиоваскуларних оштећења. У експерименталним студијама показао се веома корисним у превенцији можданог удара код спонтано хипертензивних пацова као и смањење величине инфаркта мозга код мишева са идукованим можданим ударом. Недостатак минералокортикоидног рецептора на макрофазима доводи до смањења постисхемичког инфламаторног одговора као и смањења величине инфаркта мозга након можданог удара.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија

Експериментална популација

За доказивање антиинфламаторног дејства спиринолактона након исхемично-реперфузионог оштећења мозга користиће се експериментална студија *in vivo* на мушким јединкама C5BL6 мишева (n=40) тежине 22-25 грама чуваних у режиму светло-мрак по 12 часова дневно са неограниченим приступом храни и води и експериментална студија *in vitro* на комерцијалној ћелиској линији мишијих ендотелних ћелија мозга (bEnd.3; ATCC) у условима препорученим од стране добављача. Експерименталне животиње ће бити узорковане случајним избором из популације фарме експерименталних животиња, одговарајућег ранга старости мушког пола, Универзитета у Мичигену, уз дозволу одговарајућих надлежних тела према протоколу бр. ПРО00001309.

Материјал и методе

У *In vivo* студији ће се формирати 4 експерименталне групе, са по 10 јединки на следећи начин: 1. Контрола (sham) - животиње код којих је само урађена инцизија средине врата и након тога зашивене, 2. Контрола (sham)+Спиро- животиње са инцизијом врата и третманом спиринолактоном (1mg/kg/дневно, IP) након завршене операције у трајању од 24 часа, 3. И/Р- животиње код којих је урађена мождана исхемија 45 минута са реперфузијом од 24 часа, 4. И/Р+Спиро- животиње којима је након мождане исхемије од 45 минута дат спиринолактон (1mg/kg/дневно, IP) на почетку реперфузије која ће трајати 24 часа.

У *in vitro* студији биће коришћена по три одвојена сета експеримената подељених у 4 експерименталне групе. 1. Контрола- ћелије без икаквог третмана, 2. Контрола+Спиро- ћелије третмане спиринолактоном (5μM), 3. И/Р- ћелије изложене исхемији и реперфузији, 4. И/Р+Спиро- ћелије изложене исхемији и реперфузији са третманом спиринолактоном (5μM).

За *in vivo* модел можданог удара користиће се транзијентна оклузија средње мождане артерије помоћу комерцијално набављеног интралуминалног филамента. Сам модел преставља увођење интралуминалног филамента обложеног силиконом у крвни суд кроз малу инцизију на заједничкој каротидној артерији након чега се врши пропација филамента кроз унутрашњу каротидну артерију све до корена средње мождане артерије. Оклузија средње мождане артерије трајаће 45 минута након чега ће се филамент извадити и омогућити реперфузија ткива од 24 часа. Цела хирушка интервенција биће обављана у складу са одредницама добре лабораторијске праксе. Декапитацијом ће бити узет мозак за даље анализе.

За *in vitro* испитивања биће коришћен модел кисеонично-глукозне депривације (OGD) ћелија у аноксичној комори у трајању од 5 сати у медијуму без глукозе (Invitrogen Corp. No glucose DMEM), са реперфузијом од 2 или 24 часа у инкубатору при нормалним условима у медијуму са 4.5 г/л глукозе (Invitrogen Corp. DMEM medium).

За доказивање антиинфламаторног дејства малих доза спиринолактона мериће се експресија 62 различитих цитокина комерцијалним китом (RayBio Mouse Cytokine Antibody Array 3) из лизата целог мозга експерименталних животиња као и ћелиског лизата након *in vitro* експеримената. Ниво експресије цитокина ће бити зависне варијабле док ће примена лека (спиринолактона) бити независна варијабла.

За детекцију и релативну квантификацију синтетизованих азотних оксида синтетаза (eNOS, iNOS), интрацелуларног адхезионог молекула (ICAM-1) користиће се имуноблотинг протеина анализа (Western blot) специфичним антителима из ћелиског лизата као и лизата целог ткива мозга.

Семиквантитативно одређивање количине синтетизоване информационе рибонуклеинске киселине за синтезу појединих цитокина (IL1 β , IL6, TNF- α , RANTES, MCP-1, CXCL5), синтетаза азотних оксида (iNOS, eNOS), интрацелуларног адхезионог молекула (ICAM), користиће се реверзна транскрипција са полимераза ланчаном реакцијом (rtPCR).

Величина инфаркта мозга код животиња мериће се бојењем пресека ткива мозга дебљине 2 мм 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом (TTC).

Обрада података добијених наведеним методама вршиће се рачунарским програмом (ImageJ, NIH).

Пропустљивост крвних судова и мерење едема мозга код експерименталних животиња вршиће се мокро-сувим мерењем тежине ткива док ће се за *in vitro* експерименте мерити трансендотелијална резистенција (TEER) помоћу ендотелијалног волтметра (EVOM2, EndOhm-6-World Precision Instruments, Inc.).

За евалуацију молекуларног механизма антиинфламаторног дејства спиринолактона спровешће се сет *in vitro* експеримената за доказивање дејства спиринолактона на стабилизацију транскрипционог фактора NF- κ B.

Имунофлуоресцентно бојење антителима специфичним за NF- κ B коњуговано флуоресцеином уз помоћ конфокалног микроскопа (LSM 510 Zeiss, Germany) биће коришћено за визуализацију локализације овог транскрипционог фактора.

За детекцију и семиквантитативну анализу I κ B α протеина као и његове фосфорилисане форме (p-I κ B α) користиће се имуноблотинг (Western blot) специфичним антителима.

Одређивање активираниог NF- κ B транскрипционог фактора ће се вршити комерцијалним китом (TransAM[®] NF κ B P65 Kit, Active Motif, USA). Резултати ће бити представљени у односу на контролну групу, након нормализације количине активираниог NF- κ B у свакој групи са његовом количином у контролној групи, као и одређивањем тачне концентрације активираниог NF- κ B по 1 граму ткива. Ниво активираниог NF- κ B ће бити зависна варијабла док ће примена лека (спиринолактона) бити независна варијабла.

Прорачун величине узорка је спроведен на основу података о експресији примарне варијабле студије, активiranог NF-κB, код експерименталних животиња подвргнутих исхемијском можданом удару. Укупан студијски узорак је утврђен на најмање 40 експерименталних јединки.

Статистичка анализа података ће се вршити коришћењем одговарајућих статистичких програма. За тестирање разлика међу групама користиће се неупарени студент т-тест, АНОВА и МАНОВА тест. За *post hoc* поређење користиће се Tukey's и Bonferoni's тест. $P < 0.05$ ће се сматрати статистички значајним.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекивани резултати довешће до откривања молекуларног механизма антиинфламаторног ефекта спиронолактона на ендотелне ћелије мозга и указаће на до сада непознату улогу спиронолактона у модификовању инфламаторног одговора ткива мозга након исхемије. У исто време отвориће нове могућности третмана исхемичног можданог удара као и других инфламаторних стања ендотела која фаворизују настанак можданог удара.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Реперфузионо оштећење ткива након тромболитичке терапије исхемичног можданог удара представља главну компликацију за коју не постоји адекватна антиинфламаторна терапија која би спречила отварање крвномождане баријере, развој едема, хеморагије и додатног оштећења можданог ткива. Циљ ове студије је да испита потенцијал малих доза спиронолактона на супресију инфламаторног одговора ткива мозга а пре свега ендотелних ћелија мозга након реперфузије код *in vivo* и *in vitro* модела исхемичног можданог удара.

2.10. Предлог ментора

За ментора рада, Комисија предлаже проф. др Анушку Анђелковић-Zochowska, редовног професора Медицинског факултета у Мичигену, Ен Арбор (Ann Arbor), Сједињене Америчке Државе, за уже научне области Неуропатологија

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Неуронауке, неуропатологија

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Гордана Тончев**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неурологија
3. **Проф. др Александар Рашковић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета у Новом Саду, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата, кандидат др Никола Сладојевић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Студија би била оригинално научно дело, где би се испитивао ефекат малих доза спиринолактона на инфламаторни фенотип ендотелних ћелија мозга код мишијег модела исхемичног možданог удара.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Николе Сладојевића, под менторством проф. др Анушке Андђелковић-Zochowska, бити од великог научног значаја у смислу дефинисања антиинфламаторног дејства малих доза спиринолактона и бенефите ове терапије на реперфузионо оштећење мозга код мишијег модела исхемичног možданог удара.
4. Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Николе Сладојевића под називом „**Утицај малих доза спиринолактона на инфламаторни одговор проузрокован реперфузијом možданог ткива у експерименталном мишјем моделу исхемичног možданог удара.**“ и одобри њену израду.

Проф. др Драган Миловановић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

Проф. др Гордана Тончев, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неурологија

Проф. др Александар Рашковић, члан, ванредни професор Медицинског факултета у Новом Саду, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

У Крагујевцу, 28.12.2012. године