

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

## **1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/35, од 13.07.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Невене Гајовић, под називом:

**“Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке”**

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Миодраг Л. Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Доц. др Јелена Пантић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

## **2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

### **2.1. Кратка биографија кандидата**

Др Невена Гајовић рођена је 04.04.1987. године у Крагујевцу, где је похађала основну школу и Прву крагујевачку гимназију. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2006/2007. године, а дипломирала је 30.07.2013. године са просечном оценом 9,22. У току студирања, школске 2007/08. и 2008/09. године била је демонстратор

на предмету Хистологија и ембриологија. Обавезан лекарски стаж обавила је у КЦ Крагујевац и ДЗ Крагујевац у трајању од 6 месеци. Школске 2013/2014. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Од 05.06.2014. године запослена је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу у звању сарадника у настави за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Студент је треће године Докторских академских студија на изборном подручју Имунологија, инфекција и инфламација. Усмени докторски испит је положила у фебруару 2016. године. Активно учествује у истраживачком раду у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Руководилац је јуниор пројекта под називом “Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег умора дојке” који се реализује на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

## **2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације**

**Наслов:** „ Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке “

**Предмет:** Испитивање утицаја дијабетес мелитуса на раст и развој тумора дојке и на модулацију антитуморског имунског одговора у експерименталном мишјем моделу карцинома дојке.

**Хипотеза:** Индукција дијабетес мелитуса стрептозотоцином убрзава раст и метастазирање тумора дојке, смањује инфилтрацију туморицидних NK ћелија и CD8<sup>+</sup> T лимфоцита у примарни тумор и смањује цитотоксички капацитет NK ћелија и CD8<sup>+</sup> T лимфоцита.

## **2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације**

Кандидат је публикувао 1 рад у целини у часопису категорије M52 у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

**Gajovic N, Jovanovic I, Plic A, Jeremic N, Jakovljevic V, Arsenijevic N, Lukic M** Diabetes mellitus directs NKT cells toward type 2 and regulatory phenotype Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (1): 35-41.

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

*Diabetes mellitus* је група метаболичких болести, коју карактерише висока концентрација глукозе у крви и настаје као последица поремећаја у секрецији или дејству инсулина. Висока концентрације глукозе у крви, карактеристична за све типове дијабетеса, је узрок настанка бројних акутних и хроничних компликација и повећане осетљивости на развој инфекција.

Бројне студије указују да су пацијенти оболели од дијабетес мелитуса подложнији развоју карцинома дојке те да се дијабетес може убројати у факторе ризика за развој овог тумора. Карцином дојке је један од водећих узрока смрти жена. Главни узрок смрти је развој метастаза у плућима, јетри, костима и мозгу. Туморско ткиво инфилтрише хетерогена популација ћелија урођене и стечене имуности. Ефекторски механизми ћелија урођене и стечене имуности играју веома важну улогу у елиминацији туморских ћелија.

Ћелије природне убице (енгл. Natural Killer cells, NK) представљају главну компоненту урођене антитуморске имуности. Активација NK ћелија строго је регулисана балансом сигнала са активаторних и инхибиторних рецептора. Цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T lymphocyte, CTL) представљају главни механизам стечене антитуморске имуности. CTLs користе исте ефекторске механизме као и NK ћелије у елиминацији туморских ћелија. Хипергликемија на бројне начине утиче на функције ћелија, између осталог и подстицањем продукције кисеоничних слободних радикала односно развојем оксидативног стреса као и подстицањем настанка стреса ендоплазматског ретикулума. У научној литератури нема података о повезаности дијабетеса, оксидативног стреса и модулације антитуморске имуности.

Ова теза треба да разлучи у којој су мери алтерација оксидативног стреса и хипергликемијом индуковани поремећаји имуно регулације одговорни за слабији одговор на туморску ноксу у дијабетесу.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

### *Значај студије*

Значај студије се огледа у томе што би резултати овог истраживања указали на разлоге убрзаног раста и прогресије тумора дојке у хипергликемичним условима као и на евентуалне механизме у основи модулације антитуморске имуности.

### *Циљ студије*

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај дијабетес мелитуса на раст и развој тумора дојке и на модулацију антитуморског имунског одговора у експерименталном мишјем моделу карцинома дојке.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити учинак експерименталног дијабетес мелитуса на раст примарног тумора дојке, инциденцу метастазирања и параметре оксидативног стреса;
2. Испитати утицај експерименталног дијабетес мелитуса на ћелијски састав слезине и субпопулације тумор-инфилтришућих леукоцита код мишева пре и после индукције тумора;
3. Испитати како експериментални дијабетес мелитус утиче на фенотипске и функционалне карактеристике и цитотоксички капацитет NK ћелија и CD8<sup>+</sup> T лимфоцита, пре и после индукције тумора;
4. Испитати повезаност појачаног оксидативног стреса и стреса ендоплазматског ретикулума са променом функционалног фенотипа NK ћелија, CD8<sup>+</sup>T лимфоцита и имunosупресивних ћелија мишева са хипергликемијом;
5. Испитати да ли је доминантан утицај хипергликемије или оксидативног стреса на промену функционалног фенотипа NK ћелија и CD8<sup>+</sup>T лимфоцита;

## **2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

Подстицањем продукције кисеоничних слободних радикала односно индукцијом стреса ендоплазматског ретикулума хипергликемија мења фенотипске и функционалне карактеристике ћелија урођене и стечене имуности: подстиче пролиферацију макрофага, фагоцитозу и продукцију проинфламацијских цитокина, онемогућава дегранулацију

неутрофила и смањује продукцију мијелопероксидазе, инхибира пролиферацију  $\gamma\delta$ T лимфоцита и тиме значајно редукује број ових лимфоцита у кожи, подстиче експресију рецептора чистача SR-A, CD36 and LOX-1 на дендритским ћелијама и продукцију проинфламацијских цитокина, подстиче продукцију глукокортикоида који имају лимфотоксични ефекат и тиме изазива лимфопенију. Показано је да хипергликемија смањује број NK ћелија, а утиче и на њихов функционални фенотип тако што инхибира експресију активационих рецептора NKp30, NKp46, NKG2D, смањује синтезу mRNA за перфорин као и секрецију IFN- $\gamma$ . Међутим, досадашње студије нису испитивале туморицидни капацитет NK ћелија и CD8<sup>+</sup> T лимфоцита у хипергликемији.

Икемура и сарадници су у експерименталном моделу малигног меланома показали да у условима хипергликемије и појачаног оксидативног стреса водоник пероксид подстиче експресију адхезивних молекула ICAM-1 на ендотелним ћелијама крвних судова што за последицу има олакшано миграње туморских ћелија и бржи развој метастаза.

## **2.7. Методе истраживања**

### **Врста студије**

Експериментална студија на животињама, *in vivo*.

### **Експерименталне животиње**

Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја BALB/C, женског пола, старости од 6 до 8 недеља које се узгајају у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Неговање животиња ће бити према прописаним узгојним условима све до завршетка експеримента. Целокупан рад са животињама у овој студији ће се обављати уз одобрење Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

### **Узорковање**

Јединке ће се методом случајног узорка одвајати у кавезе по групама, тако да ће бити формирано четири експерименталне групе:

1. првој групи индуковаће се хипергликемија и тумор дојке
2. другој групи индуковаће се само хипергликемија
3. трећој групи биће индукован само тумор дојке
4. четврта група је контролна за здравим мишевима

### **Индуковање хипергликемије**

Хипергликемија ће се индуковати нултог дана експеримента интраперитонеалном апликацијом стрептозотоцина раствореног у цитратном пуферу (pH=4,8) у једној дози од 170mg/kg.

### **Индуковање тумора**

Тумор ће се индуковати двадесетосмог дана експеримента апликацијом слабо имуногене ћелијске линије малигног тумора дојке 4T1, сингене за BALB/C мишеве. Туморске ћелије ће се узгајати у *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) у који је додат *Fetal Bovine Serum*, *L-glutamine*, *penicillin/streptomycin* и неесенцијалне аминокиселине. Чуваће се у инкубатору на 37<sup>0</sup>C са 5% CO<sub>2</sub>. Туморске ћелије ће се убризгавати субкутано, директно у млечну жлезду број 4 у дози од 5x10<sup>4</sup>/50μl медијума.

### **Варијабле које се мере у студији**

**Независне варијабле:** хипергликемија

**Зависне варијабле:** величина примарног тумора, маса примарног тумора, број и величина метастатских колона, параметри оксидативног стреса и стреса ендоплазматског ретикулума, ћелијски састав слезине и субпопулације тумор-инфилтришућих леукоцита, фенотипске и функционалне карактеристике и цитотоксички капацитет НК ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита

**Збуњујуће варијабле:** не постоје

## **Мерење телесне масе, гликемије и гликозурије**

Динамика промене телесне масе пратиће се сваке недеље појединачним мерењем мишева. Ниво глукозе у пуној крви наше мери се једном недељно током трајања експеримента. Крв за анализу се добија пункцијом репне вене након 4h гладовања, а потом се кап крви наноси на траку за мерење гликемије. Вредност гликемије се читава на глюкометру за сваког миша појединачно.

## **Мерење величине примарног тумора**

Величина примарног тумора одређиваће се морфометријски. Запремина тумора се израчунава по формули

$$V(\text{mm}^3) = \frac{L (\text{највећи пречник}) \times W^2 (\text{најмањи пречник})}{2}$$

## **Верификација броја и величине метастаских колонија**

Мишице се жртвују цервикалном дислокацијом 35 дана након индукције тумора, након чега им се узима крв из абдоминалне аорте. Изоловаће се примарна туморска маса, слезина, плућа и јетра. Направиће се парафински препарати од ткива плућа и јетре и обојити еозин-хематоксилинским бојењем. Микроскопирањем ће се одредити број и величина метастатских колонија.

## **Одређивање концентрације цитокина у серуму**

Вредности про- и анти- инфламацијских цитокина ће се одређивати 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 слезина и примарни тумор. Пропуштањем слезине кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) добиће се суспензија појединачних

спленоцита. Изоловано туморско ткиво ће се уситнити и инкубирати у медијуму за ензимску дигестију који ће садржати 1 mg/ml колагеназе I, 1mM EDTA и 2% FBS-а. Након двочасовне инкубације на 37°C уз мешање на 150 rpm, медијум за ензимску дигестију замениће 10 ml претходно загрејани 0.25% трипсин и инкубираће се 3 минута. Затим ће уследити инкубација у ензиму DNA-за I, 1 минут на 37°C уз мешање на 150 rpm. Пропуштањем кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) добиће се суспензија појединачних ћелија. Коришћењем анти-CD49b (позитивна селекција NK ћелија) и анти-CD4, анти-CD11b, анти-CD11c, анти-CD19, анти-CD45R (B220), анти-CD49b (DX5), анти-CD105, анти-MHC Class II, анти-Ter-119 и анти-TCR $\gamma/\delta$  (негативна селекција CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита) магнетима конјугованих антитела и пропуштањем претходно изолованих спленоцита кроз LS колоне магнетног MACS сепаратора изоловаће се NK ћелије односно CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити.

### **Цитотоксичност ћелија**

Цитотоксичност NK ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита мериће се на Roche Xcelligence машини. Првог дана ће се поставити ћелије 4T1 туморске линије (10<sup>4</sup> ћелија по бунару) у плочу са златним нитима. Након 24 часа ће се додати ефекторске ћелије тако да однос циљане ћелије:ефекторске ћелије буде 1:10 и пратиће се ћелијски индекс наредних 48-72 часа.

### **Ћелијски састав слезине и мононуклеарног инфилтратата примарног тумора**

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, CD25, F4/80, Foxp3, Ly6G, Ly6C, Lin coct, Sca-1, MHC II, CD86, Gr1) одређиваће се процентуални удео и укупан број различитих популација леукоцита у слезини и примарном тумору.

### **Квантификација и фенотипизација NK ћелија**

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD3, CD19 и NKp46) одређиваће се процентуални удео и укупан број NK ћелија у слезини и примарном тумору. Комбинацијом поменутих антитела са анти: KLRG, CD69, NKG2D, CD27, CD11b, PD-1, Fas-L, CD107, IFN- $\gamma$  и IL-10 одредиће се фенотипске и функционалне карактеристике NK ћелија пре и после апликације тумора.



### **Квантификација и фенотипизација CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита**

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD3 и CD8) одредиће се процентуални удео и укупан број CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у слезини и примарном тумору. Комбинацијом поменутих антитела са анти: KLRG1, CD69, NKG2D, Fas-L, CD107a, PD-1, IFN- $\gamma$ , перфорином и гранзимом одредиће се фенотипске и функционалне карактеристике CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита након апликације тумора.

### **Квантификација и фенотипизација имуносупресивних ћелија**

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD4, FoxP3, Cd11b Cd11c и Gr1) одредиће се процентуални удео и укупан број регулаторних Т лимфоцита и мијелоидних супресорских ћелија у слезини и примарном тумору. Комбинацијом поменутих антитела са анти: И-10, TGF- $\beta$ , ЛубG, ЛубC одредиће се фенотипске и функционалне карактеристике регулаторних Т лимфоцита и мијелоидних супресорских ћелија пре и након апликације тумора.

### **Анализа функционалног фенотипа NK/CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита *in vitro***

Спленоцити здравих мишева ће се инкубирати у серуму хипергликемичних мишева, серуму нормогликемичних мишева и серуму нормогликемичних мишева коме је додата глюкоза. Након 24-48 сати, анализираће се функционални фенотип NK ћелија и CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита.

### **Мерење експресије параметара стреса ендоплазматског ретикулума**

Методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену (*Real-time quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction*, RT-PCR) измерићемо експресију mRNA молекула NKG2D, DAP10, sXBP1, ATF4, CHOP, BiP, GRP94, EDEM, usXBP1, Total XBP1 у претходно изолованим NK ћелијама. RNA се изолује и третира DNA-зом према упутству. Укупан RNA узорак се реверзно преписује, а потом амплификује коришћењем *sense* и *antisense* прајмера.

## **Снага студије и величина узорка**

Величина узорка израчуната је на основу студије Јовановић И et al. из 2011. године. На основу учесталости појаве метастаза у плућима код WT мишева која је била 86% и учесталости код ST2-/- која је износила 25%, потребна величина узорка за ниво значајности  $\alpha=0,05$  и статистичку моћ теста  $1-\beta$  од 80% израчуната је потребна величина узорка од 20 експерименталних животиња. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student-ов t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије  $\geq 80\%$ . За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 20.

## **Статистичка обрада података**

Подаци ће се анализирати коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности. Уколико вредности буду имале правилну расподелу користићемо параметарски Student-ов 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**

*Diabetes mellitus* је болест у експанзији. Процењује се да ће број особа оболелих од дијабетеса да се удвостручи у периоду од 2000. до 2030. године. Ово истраживање би требало да по први пут испита да ли и на који начин хипергликемија утиче на раст и метастазирање тумора дојке. Откриће нам утицај хипергликемије на модулацију урођеног и стеченог антитуморског одговора као и механизме заслужне за ову модулацију.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Мерењем величине примарног тумора и верификацијом метастатских колонија, биће испитан утицај хипергликемије на раст и прогресију мишјег тумора дојке. Проточном цитометријом, мерењем цитокина у серуму, тестом цитотоксичности и PCR-ом анализираће се утицај хипергликемије на модулацију антитуморског имунског одговора.

## 3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

### 3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Milosavljevic MZ, **Jovanovic IP**, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(14): 18106-18115.
2. **Jovanovic I**, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. *Int J Cancer* 2014; 134(7):1669-16682.
3. Pejnovic N, Pantic J, **Jovanovic I**, Radosavljevic G, Milovanovic M, Nikolic I, Zdravkovic N, Djukic A, Arsenijevic N, Lukic M. Galectin-3 Deficiency Accelerates High-Fat Diet Induced Obesity and Amplifies Inflammation in Adipose Tissue and Pancreatic Islets. *Diabetes* 2013;62(6):1932-1944.
4. **Jovanovic I**, Pejnovic N, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 Axis in Innate and Acquired Immunity to Tumors. *OncoImmunology* 2012; 1(2):229-231

5. **Jovanovic I**, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S. and Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. Eur J Immunol 2011; 41(7):1902-1912.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина. Ужа област: Имунологија, инфекција, инфламација

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Миодраг Ј. Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Доц. др Јелена Пантић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

### **Закључак и предлог комисије**

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Невене Гајовић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај експерименталног дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке као и на модулацију антитуморског имунског одговора.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Невене Гајовић „Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке“ и одобри њену израду.

### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

1. **Проф. др Миодраг Л. Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

---
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

---
3. **Доц. др Јелена Пантић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

---

**У Крагујевцу, 29.07.2016.**