

1. Одлука Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-5586/3-3 од 3.6.2015. год, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Немања Јовичића** под називом:

" ИМУНОМЕТАБОЛИЧКИ ФЕНОТИП МИШЕВА СА ДОМИНАНТНИМ *TH1* И *TH2* ИМУНСКИМ ОДГВОРОМ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ "

На основу одлуке Научно-наставног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Академик, проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Немања Јовичић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

Немања (Угљеша) Јовичић је рођен 4.4.1981. у Новом Саду. Основне студије на Медицинском факултету у Крагујевцу започео је октобра 2000. године. Дипломирао је 20.04.2010. године са просечном оценом 8.71. Академске докторске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је школске 2010/2011. године, изборно подручје Молекулска медицина: имунологија, инфекција, инфламација, а усмени докторски испит је

положио 17.07.2013. са оценом 9 (девет). На основу конкурса објављеног 6.4.2011. године изабран је у звање сарадник у настави за ужу научну област Хистологија и ембриологија Медицинског факултета у Крагујевцу. У звање сарадник у звању асистента за ужу научну област Хистологија и ембриологија изабран је на основу конкурса објављеног 19.6.2013. године.

Б. Научно истраживачки рад

Кандидат, др мед. Немања Јовичић се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. Учесник је Макро пројекта, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

1. МП 01-12 „Имунопатологија инфламаторних, аутоимунских и малигнух обољења“

Као и међународног SCOPES пројекта под називом:

1. IZ73Z0_152407 „Galectin-3 in the pathogenesis of type 2 diabetes: the role in β -cell proliferation, insulin secretion and anti-inflammatory mechanisms within islets“

Такође је учесник и Јуниор пројекта, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

1. ЈП 02-14 „Улога Галектина – 3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности“
2. ЈП 03-14 „Улога IL – 33/ST2 сигналног пута у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности“
3. ЈП 12-14 „Анализа фактора значајних у диференцијалној дијагнози узрочника фебрилних стања непознате етиологије“

В. Подаци о објављеним радовима

В1. Радови објављени у часописима међународног значаја (Категорија М20)

1.1. Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, **Jovicic N**, Lukic A. ST2 Deletion Increases Inflammatory Bone Destruction in Experimentally Induced Periapical Lesions in Mice. *J Endod.* 2015. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.017 **M21=8 бодова**

1.2. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33 Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *MolMed*, doi: 10.2119/molmed.2014.00178. *in press* **M21=8 бодова**

В2. Зборници међународних скупова (Категорија М30)

2.1. Velickovic M, Pejnovic N, **Jovicic N**, Kanjevac T, Lukic A. The effects of ST2 deletion on the formation of experimentally-induced periapical lesions in mice. 19th Congress of the Balkan stomatological society, Belgrade, Serbia, April 2014. Abstract book, pp 214 **M34=0.5 бодова**

2.2. **Jovicic N**, Pejnovic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic L.M. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. EASL monothematic conference Microbiota, metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. Abstract book, pp 114 **M34=0.5 бодова**

2.3. Jeftic I, **Jovicic N**, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic L.M, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book, pp 54 **M34=0.5 бодова**

2.4. **Jovicic N**, Pejnovic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic L.M. Immunometabolic Differences in Prototypical Th1 and Th2-Type Mouse Strains in High-Fat Diet Induced Obesity. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book, pp 53 **M34=0.5 бодова**

V3. Часописи националног значаја (Категорија M50)

3.1. **Jovicic N**, Jeftic I, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic L M, Pejnovic N. ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c Mice. Serb J Exp Clin Res 2015; 16(1): 9-20 **M52=1.5 бодова**

3.2. **Јовичић Н**, Јефтић И, Јовичић У. Улога Б лимфоцита у развоју мултипле склерозе и експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса. PONS -медицински часопис 2013. Volumen 10 No 3; 109-118 **M53=1 бод**

3.3. Милетић Ковачевић М, Илић С, Танасковић И, Росић В, **Јовичић Н**, Саздановић М. Хистолошке карактеристике и класификације коарктације аорте. Рационална терапија 2013. Volumen 5 No 2; 61-73 **M53=1 бод**

3.4. Tanasković Stanković S, Sazdanović M, **Jovičić N**, Milovanović J, Lacković M. Modern view on the structure of the vascular extracellular matrix. Med Čas. 2015; 49(1);doi:10.5937/mckg 49-6844 **M53=1 бод**

V4. Зборници скупова националног значаја (Категорија M60)

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

"Имунометаболички фенотип мишева са доминантним Th1 и Th2 имунским одговором у експерименталном моделу гојазности"

Предмет:

Гојазност је хронично обољење које карактерише прекомерно и ектопично накупљање масног ткива у организму и које претставља главни фактор ризика за развој метаболичких поремећаја укључујући инсулинску резистенцију, тип 2 дијабетес, неалкохолну масну болест јетре, атеросклерозу и друге болести.

Истраживања у последњих десет година су јасно показала да имунски систем има значајну улогу у метаболичким поремећајима. Ово откриће укључује и значај инфламације посредоване ћелијама урођене и стечене имуности у развоју гојазности и метаболичког синдрома. У хуманој популацији и експерименталним животињама јасно је показано да осетљивост на велики број болести може зависити од имуногенетских фактора који поред осталог одређују и преовлађујући тип имунског одговора. Тако, M1/Th1 индивидуе имају снажан целуларни имунски одговор, док M2/Th2 индивидуе развијају чешће и интензивније агресивне имунске реакције као што су алергијске реакције и одговор на неке инфекције.

Гојазност карактерише постојање инфламације у увећаном висцералном адипозном ткиву и хронична системска инфламација ниског степена, означена као метаболичка инфламација (метафламација), чији молекуларни механизми нису довољно разјашњени. У физиолошким условима у масном ткиву преобладава антиинфламаторни M2/Th2 тип имунског одговора, док у гојазном масном ткиву преобладава проинфламаторни M1/Th1 имунски одговор. Предложеним истраживањима хоћемо да утврдимо у којој мери Th1 и Th2 фенотип утиче на развој гојазности, метаболичког синдрома и неалкохолне масне болести јетре.

Као експерименталне животиње биће коришћени мишеви соја C57BL/6 (енгл. wild-type, WT), соја BALB/c (WT), као и ST2 дефицијентни (енгл. knockout, ST2^{-/-}) мишеви соја BALB/c мушког пола, старости од 6 до 8 недеља. Гојазност ће бити индукована применом дијете са високим садржајем масти (60% калорија пореклом из масти) у трајању од 24 недеље. Метаболички параметри током развоја гојазности биће праћени периодично. Параметри инфламације (степен и фенотип инфилтрованих имунских ћелија и експресија интраћелијских цитокина) биће одређивани у циљним ткивима, масном ткиву и јетри након жртвовања методом проточне цитометрије и имунохистохемије/имунофлуоресценције. Степен масне инфилтрације и фиброзе јетре биће одређивани специјалним хистолошким бојењима, и квантификовани корићењем одговарајућег система бодовања као и рачунарског програма *ImageJ*. Нивои инсулина и цитокина у серуму биће одређивани ELISA тестом, а нивои липида и активност трансминаза фотометријским методама. Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе ћемо испитати нивое експресије гена који учествују у инфламацији, метаболизму масти и фибрози у масном ткиву и јетри.

Очекујемо да Th2 доминантни BALB/c мишеви буду резистентни на развој гојазности, увећање висцералног масног ткива и инфламацију, праћену мање израженом стеатозом, инфламацијом и фиброзом јетре, у поређењу са Th1 доминантним C57BL/6 мишевима. Очекујемо да ће код C57BL/6 мишева доминантни Th1 имунски одговор довести до израженије инфламације у масном ткиву и јетри са последично израженијом фиброзом јетре. Очекујемо да постоје разлике у регулацији гена укључених у инфламаторни одговор, метаболизам липида и фиброзу јетре у наведеним сојевима мишева. Прелиминарни резултати су у сагласности са овим претпоставкама. Како новије студије показују да генетска манипулација IL-33/ST2 осовине код мишева на BALB/c основи може изменити осетљивост на развој запаљенских болести, односно приближити је осетљивости C57BL/6 сојева, очекујемо да делеција ST2 молекула у BALB/c соју мишева резултира сличном осетљивости на развој гојазности, метаболичке инфламације у масном ткиву и јетри и израженијом фиброзом јетре као код Th1 доминантног C57BL/6 соја мишева.

Хипотезе:

Гојазност, метафламација, поремећај гликорегулације и неалкохолна масна болест јетре индуковани дуготрајном дијетом са високим садржајем масти су израженији у C57BL/6 соју мишева са доминантним Th1 имунским одговором и ST2 дефицијентних BALB/c мишева, док су BALB/c мишеви са доминантним Th2 имунским одговором резистентни на развој метаболичких поремећаја.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат, др мед. Немања Јовичић положио је усмени докторски испит 17.07.2013. са оценом 9 (девет). У току студија објавио је више радова у часописима међународног и националног значаја, од чега једна као први аутор чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Имунски систем и метаболизам представљају фундаменталну основу неопходну за преживљавање. Механизми имунског одговора и метаболичке регулације представљају еволутивно конзервиране функције организма. Њихова међусобна усклађеност представља централни механизам хомеостазе и стога поремећаји функције чине основу за развој различитих хроничних метаболичких поремећаја, гојазности, метаболичког синдрома и кардиоваскуларних обољења. Гојазност представља хроничну болест која се карактерише прекомерним накупљањем масног ткива у организму и повећањем телесне тежине. Прекомерна тежина представља шести најзначајнији фактор ризика који доприноси укупном оптерећењу болешћу (енг: *overall burden of disease*) у свету. Гојазност и прекомерна тежина су основни фактори ризика за развој широког спектра болести, од инсулинске резистенције и типа 2 дијабетеса до атеросклерозе и неалкохолне масне болести јетре. Гојазност и удружене болести су међусобно повезани са хроничном инфламацијом ниског степена коју карактерише повећана регрутација имунских ћелија у висцерално масно ткиво. Сматра се да главну улогу у започињању имунског одговора има одговор адипоцита према сигнаlima опасности који настају током повећаног калоријског уноса. Растуће масно ткиво код гојазних особа је инфилтрирано Th1 и NKT ћелијама које продукују IFN- γ , што прати појачана регрутација M1 макрофага активираних класичним путем и смањење броја M2 макрофага активираних алтернативним путем. Активирани макрофаги продукују проинфламаторне цитокине IL-1 β , IL-6 и TNF- α , који доприносе системског инфламацији и имају негативан утицај на инсулинску сензитивност.

Неалкохолна масна болест јетре (енгл. *NAFLD - Nonalcoholic fatty liver disease*) подразумева широк опсег поремећаја које карактерише повећана акумулација липида унутар јетре. Ови поремећаји, који се крећу у распону од бенигне статозе јетре до неалкохолног стеатохепатитиса (енгл. *NASH - Nonalcoholic steatohepatitis*), цирозе и хепатоцелуларног карцинома, представљају водећи узрок хроничне болести јетре у развијеним земљама. Сматра се да је преваленца NAFLD 20-30% у општој популацији, а чак 75-100% код гојазних особа. Код 20% пацијената са NAFLD развија се хронична инфламација у јетри односно NASH. И поред ових чињеница, узрочници и молекуларни механизми који доводе до прогресије болести и NASH још увек нису довољно разјашњени. Експериментални подаци показују да инфламацију у NASH-у узрокују различити фактори: инсулинска резистенција, системска липотоксичност због прекомерног уноса хране, продукти метаболизма липида, проинфламаторни цитокини, адипокини, ендотоксин и други фактори. Молекулска патогенеза NASH-а је још увек у великој мери непозната. Деј и Џејмс (енг. *Day, James*) су 1998. поставили хипотезу „два удараца“. „Први ударац“ представља екцесивну акумулацију липида у хепатоцитима која је последица инсулинске резистенције. „Други ударац“ који изазива оштећење хепатоцита, инфламацију, након тога и фиброзу, настаје под утицајем различитих фактора. Сматра се да су најзначајнији фактори оксидативни стрес као последица митохондријалне β -оксидације масних киселина, продукција проинфламаторних цитокина и адипокина од стране висцералног адипозног ткива (ВАТ), ендотоксин из бактерија пореклом из гастроинтестиналног тракта (ГИТ), активација инфламазома. Досадашња истраживања мишијег модела индуковане гојазности су показала да се хронична инфламација ниског степена (енгл. *low-grade inflammation*) у ВАТ-у развија у периоду од 6. до 16. недеље, а у јетри између 16. и 26. недеље. Најзначајнији показатељи инфламације у јетри су интерлеукин (IL)-1 β , фактор некрозе тумора (енгл. *tumor necrosis factor, TNF*) – α и CD11c⁺ и CD11b⁺ макрофаги. Такође активација *Toll-like* рецептора 4 (TLR - engl. *Toll-like receptor*) слободним масним киселинама или ендотоксином пореклом из ГИТ-а, изазива активацију NF κ B (енгл. *Nuclear factor- κ B*) укљученог у регулацију експресије проинфламаторних гена. Услед тога настаје продукција проинфламаторних хемокина и цитокина који имају снажан ефекат на регрутовање циркулишућих макрофага у јетру, као и на активацију Купферових и стелатних ћелија јетре, кључних ћелија у процесу фиброгенезе. Поред тога, студије су

показале да хепатоцити изложени дејству палмитинске киселине у садејству липополисахарида продукују IL-1 β . Болест може напредовати у правцу цирозе при чему велики значај има „трећи ударац“ који, индукцијом диференцијације стелатних ћелија и њиховом трансформацијом у миофибробласте промовише фиброзу. Имуни одговор се у току овог процеса помера у правцу Th2, а макрофаги се поларизују у правцу M2 фенотипа. IL-13 има велики значај у развоју фиброзе јетре у NASH-у. Механизам којим IL-13 фаворизује процес фиброзе подразумева стимулацију продукције TGF- β 1.

Експериментални модел који у потпуности одражава комплексне имунске механизме који учествују у развоју ових метаболичких поремећаја још увек није дефинисан. У испитивању метаболичких обољења повезаних са гојазношћу користи се низ различитих сојева мишева, као и нокаут (енг: knockout) и трансгених модела. Описане сојно зависне разлике у развоју неалкохолног стеатохепатитиса и фиброзе јетре могу бити удружене са различитим имунским и инфламаторним одговором на метаболичке молекуле "опасности" (енг: danger molecules). Постоје докази да ћелијски посредована имунска активација може имати утицај на хроничну инфламацију изазвану гојазношћу, инсулинску резистенцију и дијабетес. C57Bl/6 и BALB/c мишеви представљају сојеве који се често користе у испитивању имунорегулације. На основу предиспозиције ка развоју Th1 одговора код C57Bl/6 мишева и Th2 одговора код BALB/c мишева, сматрају се репрезентативним Th1 односно Th2 сојем. Поред разлике у типу Т зависног имунског одговора, показана је разлика у одговору макрофага на различите стимулусе. Све је више доказа који показују да је баланс између M1 и M2 макрофага и Th1 и Th2 лимфоцита од кључног значаја за исход многих обољења, укључујући метаболичке поремећаје повезане са гојазношћу. Показано је гојазност утиче на промену фенотипа резидентних макрофага у висцералном масном ткиву. Од интереса је испитивање да ли инхерентне карактеристике макрофага и Th1 или Th2 лимфоцити утичу на развој гојазности и метаболичког синдрома. У гојазности постоји повећана заступљеност дендритских ћелија у висцералном масном ткиву и јетри, које утичу на повећану инфилтрацију макрофага што доприноси системским метаболичким поремећајима. Ова два соја мишева су нарочито погодни за испитивање имунометаболичких процеса, с обзиром на доступност "knock out" модела на C57Bl/6 и BALB/c основи код којих су уклоњени гени повезани са функцијом релевантних ефекторских молекула урођене и стечене имуности. Новија истраживања су показала да генетска манипулација IL-33/ST2 осовине на BALB/c основи може изменити резистенцију мишева у различитим експерименталним моделима аутоимунских болести, при чему подложност соја за развој болести постаје слична C57Bl/6 соју.

Експерименти на ST2 дефицијентним BALB/c мишевима су замишљени као тестирање могућег узрока разлика у гојазности и неалкохолне масне болести јетре у C57Bl/6 и BALB/c мишевима. Наиме, ако је ST2 делеција уклонила резистенцију на ЕАЕ, тип 1 дијабетес и инфламаторни хепатитис претпоставка је да би аблација гена за ST2 уклонила резистенцију на развој гојазности, инфламацију и повезане метаболичке поремећаје покренуте дијетом са високим садржајем масти.

Интерлеукин 33 (IL-33) припада IL-1 фамилији цитокина. IL-33 може имати улогу алармина, када се пасивно отпушта из ћелије након њеног оштећења или некрозе и има такозвану "некротину" активност, или може бити интракритички негативни регулатор транскрипције NF κ B гена. IL-33 се везује за рецепторски комплекс на плазма мембрани који чине ST2L и IL-1R молекули. ST2L је експримиран на различитим ћелијама имунског система али и на многим другим типовима ћелија. IL-33/ST2 сигнални пут може учествовати у поларизацији у правцу Th1 или Th2 имунског одговора у зависности од патофизиолошког процеса, типа активираних ћелија, микросредине и цитокинска мреже у оштећеном ткиву. Показано је да IL-33 има протективну улогу у развоју гојазности, инфламације у висцералном масном ткиву и атеросклерозе у мишијем моделу гојазности.

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

Главни циљ истраживања

1. Испитати разлике у развоју гојазности, инфламације у висцералном масном ткиву, гликорегулације, стеатозе, стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти у C57BL/6 мишева са доминантним Th1 и BALB/c мишева са доминантним Th2 имунским одговором;
2. Испитати разлике у развоју гојазности, инфламације у висцералном масном ткиву, гликорегулације, стеатозе, стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти у ST2 дефицијентних BALB/c мишева у односу на Th1 и Th2 доминантне мишеве

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Пратити развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести;
2. Утврдити параметре гликорегулације;
3. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву;
4. Дефинисати и квантификовати масну инфилтрацију јетре (стеатозу јетре) коришћењем селективног хистохемијског бојења;
5. Дефинисати и квантификовати стеатохепатитис применом бодовног система усклађеног са експерименталним моделом болести (инфилтрација 0-3, стеатоза 0-4, фиброза 0-4, "балон" дегенерација хепатоцита 0-1)
6. Дефинисати и квантификовати фиброзу јетре коришћењем селективног хистохемијског бојења;
7. Испитати биохемијске параметре оштећења јетре одређивањем концентрације АЛТ и АСТ у серуму;
8. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и процесу фиброзе у јетри;
9. Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у панкреасним острвцима;
10. Утврдити концентрације цитокина IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-33, IL-13, и TGF- β у системској циркулацији;
11. Одредити нивое експресије гена значајних за метаболизам масти у висцералном масном ткиву и јетри и методом квантитативне ланчане реакције полимеразе;
12. Одредити нивое експресије гена значајних за инфламаторни одговор у висцералном масном ткиву и јетри методом квантитативне ланчане реакције полимеразе;

13. Одредити нивое експресије гена значајних за фиброзу у јетри методом квантитативне ланчане реакције полимеразе;

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Истраживања у последњих десет година су јасно показала да имунски систем има значајну улогу у метаболичким поремећајима. Ово откриће укључује и значај инфламације посредоване ћелијама урођене и стечене имуности у развоју гојазности и метаболичког синдрома. У физиолошким условима у масном ткиву преобладава антиинфламаторни M2/Th2 тип имунског одговора, док у гојазном масном ткиву преобладава проинфламаторни M1/Th1 имунски одговор. Предложеним истраживањима хоћемо да утврдимо у којој мери Th1 и Th2 фенотип утиче на развој гојазности, метаболичког синдрома и неалкохолне масне болести јетре. Како новије студије показују да генетска манипулација IL-33/ST2 осовине код мишева на BALB/c основи може изменити осетљивост на развој запаљенских болести, односно приближити је осетљивости C57Bl/6 сојева, очекујемо да делеција ST2 молекула у BALB/c соју мишева резултира сличном осетљивости на развој гојазности, метаболичке инфламације у масном ткиву и јетри и израженијом фиброзом јетре као код Th1 доминантног C57Bl/6 соја мишева.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње:

Планирано истраживање биће спроведено на мишевима соја C57BL/6 (енгл. wild-type, WT), BALB/c (WT) и ST2 дефицијентним (енгл. knockout, ST2^{-/-}) BALB/c мишевима мушког пола, старости од 6 до 8 недеља. Све животиње биће одгајане под стандардним условима у виваријумима Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уз приступ води и храни *ad libitum*. Све експерименталне и контролне групе животиња садржаће по 10 мишева. Укупан број животиња потребних за реализацију истраживања је 60 мишева.

Индукција гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a:

Планирани модел индукције гојазности подразумева примену специјалне дијете са високим процентом масти (60% масти, Mucedola, Milano, Italy). Контролне групе животиња биће стављене на стандардну исхрану (10% масти). Предвиђено трајање индукције гојазности је 24 недеље.

Након жртвовања животиња у атмосфери засићеној диетилетром (BETA НЕМ, Београд) предвиђена је изолација јетре и висцералног адипозног ткива из пери-гонадалних депоа за даљу анализу. Крв ће бити сакупљена након жртвовања, пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум ће се изоловати центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнути на -20°C за даљу анализу.

Праћење метаболичких параметара:

Динамика увећања телесне масе и гликемије биће праћена сваке четврте недеље. У пуној крви, добијене пункцијом репне вене након 4h гладовања, биће одређиван ниво глукозе уз помоћ глукометра (Accu-Chek Performa, Roche, Germany). Серумске концентрације липида (триглицериди, укупни холестерол), као и проценат гликозилираног хемоглобина (HbA1c) биће мерени употребом Olympus AU600 chemistry immuno analyzer-a (Olympus, Japan). Концентрација секретованог инсулина наше биће одређивана у серуму уз помоћ ELISA теста (Millipore, MA, USA) према упутству произвођача. Степен инсулинске резистенције тумачиће се на основу израчунате вредности HOMA-IR према формули: концентрација инсулина наше (mU/ml) x гликемија наше (mmol/l) / 22.5.

Одређивање нивоа цитокина у серуму:

Системски нивои IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β и IL-33 биће мерени у серуму мишева ELISA методом према унапред утврђеном протоколу (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Изолација ћелија за анализу методом проточне цитометрије (Flow cytometry):

Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције (СВФ) из висцералног адипозног ткива: Висцерално адипозно ткиво, уситњено и опрано у 3ml PBS-а, биће дигестирано у раствору 1mg/ml колагеназе тип 2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) са 2% bovine serum albumin-а (BSA, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) у PBS-у, 1h на 37°C, пропуштено кроз ћелијско сито величине 40 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и центрифугирано 5 минута на 500xg обртаја. Еритроцити у добијеном пелету биће лизирани erythrocyte lyses hypotonic buffer-ом (0.155 M NH₄Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO₃) 3 минута на собној температури. Након лизе ћелије СВФ ће бити два пута опране и ресуспендоване у RPMI 640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% fetal calf serum-а (FCS) за даљу анализу.

Изолација мононуклеара из јетре:

Изолованој јетри биће одстрањена жучна кеса. Изоловано и опрано ткиво јетре биће уситњено маказицама и пропуштено кроз ћелијско сито величине 200 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA), добијени садржај центрифугирати на 480 р.п.м. (60г) обртаја са искљученом опцијом наглог кочења („with the off break setting”) 1 минут на собној температури. Супернатант, који садржи обogaћене мононуклеарне интрахепатичне ћелије, пребацити у нову епрувету кроз ћелијско сито величине 40 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и центрифугирати на 1433 р.п.м. (480г) обртаја са укљученом опцијом наглог кочења („with the high break setting”) 8 минута на собној температури. Добијени талог ресуспендовати у erythrocyte lyses hypotonic buffer-у (0.155 M NH₄Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO₃), држати на собној температури 5 минута, онда га суплементирати са 2ml RPMI 640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% fetal calf serum-а (FCS), центрифугирати на 1433 р.п.м. (480г) укљученом опцијом наглог кочења 8 минута на собној температури. Коначно, добијени талог ресуспендовати у 1ml RPMI 640 медијуму са 10% fetal calf serum-а (FCS) провући кроз ћелијско сито величине 40 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и користити за даљу анализу.

Фенотипизација изолованих мононуклеарних ћелија јетре:

Изоловане ћелије стромалне васкуларне фракције из јетре, висцералног адипозног ткива и мононуклеарне ћелије из панкреасних острваца ће бити обележене флуорохром-коњугованим моноклонским анти-мишјим CD3, CD4, CD8, NK1.1, F4/80, CD11c, CD11b, CD206, Gr-1, IL-13 α 1, Lin соct., Sca-1, CD117 и CD25 антителима (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) или одговарајућим изотипским контролама и инкубирани 30 минута на +4°C. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије ће бити инкубирани 5 h на 37°C у присуству 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-а (PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA), 1 μ g/ml ionomycin-а (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) и 0.8 μ l Golgi Stop-а (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након инкубације, ћелије ће бити фиксирани и пермеабелизовани употребом BD Cytofix/Cytoperm kit-а (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележене одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима за IL-13, IL-1 β , TGF- β , IFN- γ , IL-17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Процена степена и састава мононуклеарног инфилтрата у панкреасним острвацима и јетри методом имунохистохемије:

Дистрибуција инфламаторних ћелија у циљним ткивима биће праћене израдом фотомикрографија и хистолошком анализом исечака одговарајућих ткива обојених *Haematoxylin eosin*-ом, употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером. За даље испитивање фенотипских карактеристика инфилтрисаних ћелија користиће се имунохистохемијско бојење. Ткивни исечци ће бити инкубирани са биотинисаним анти-мишјим F4/80, CD68 и α SMA антителима а визуелизација ће се обавити уз помоћ Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a (Abcam).

Циљана хистолошка бојења:

Формалдехидом фиксирани, парафином калуљени ткивни исечци јетре биће бојени *Haematoxylin eosin*-ом, *Sirius Red* и трихроматским бојењем по Massony, са циљем да се утврди и квантификује дистрибуција инфламаторних ћелија, дегенерација хепатоцита (балон дегенерација) и фиброза. За квантификацију стеатозе биће коришћени криосисечци ткива јетре бојени *Oil-Red O* методом. Микроскопирање исечака ткива јетре биће одрађено употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером. За дефинисање и квантификовање стеатохепатитиса користићемо скоринг систем, а микроскопирање ће обавити два независна истраживача слепом методом. За квантификацију инфламаторних ћелија и број инфилтрата користићемо следећи скор (нема инфилтрата у видном пољу (увеличање 20x) - 0; 1 инфилтрат - 1+; 2 или више инфилтрата - 2+, дифузни инфилтрати - 3+). Скор од 0 до 4 ће се користити за степен стеатозе, а односи се на број ћелија које у себи садрже маст. (нема масти у ћелијама - 0; $\leq 5\%$ ћелија - 1+; 5-33% ћелија - 2+; 34-66% ћелија - 3+; $\geq 67\%$ ћелија - 4+). Фиброза ће се квантификовати следећим скор системом (одсутна - 0, фокална - 1+, екстензивна *nonbridging* - 2+, *bridging* - 3+, цироза - 4+). Скор дегенерације хепатоцита ће се односити на присуство или одсуство балон дегенерације (одсутна - 0, присутна - 1+). Скор ће бити израчунат укупно за сваки ткивни исечак и упоређен са контролом. Врста студије

Врста студије

Тип студије према коме ће бити спроведено истраживање у целини је експериментална студија на животињама *in vivo*. Студија укључује и анализу релеватних ћелија и медијатора комплементарним техникама *in vitro*, као и хистопатолошку и имунохистохемијску анализу ткива.

Снага студије и величина узорка

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Величина узорка је израчуната на основу очекиваних вредности гликемије и телесне масе, добијених у прелиминарно урађеним експериментима. Студијски узорак је израчунат узимајући да је $\alpha=0.05$, а снага студије 0.8 за независни Т тест, 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 10 за сваку од група. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни Т тест или Mann-Whitney test) између две измерене варијабле, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 22.0.

Статистичка обрада

Све добијене вредности биће презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности биће коришћени одговарајући тестови: анализа варијансе (ANOVA) и независни Т тест за обележја са нормалном расподелом, као и Kruskal-Wallis и Mann-Whitney тестови за непараметарска обележја. За тестирање зависности између појединих варијабли користиће се тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање Pearson-овог коефицијента корелације. За обраду података користиће се статистички пакет SPSS 22.0. Статистичка значајност је одређена на $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекујемо да у C57BL/6 соју мишева са доминантним Th1 имунским одговором и ST2 дефицијентних BALB/c мишева дијета са високим садржајем масти индукује израженију гојазност, инфламацију у висцералном масном ткиву, системску метафламацију, хипергликемију, израженију неалкохолну масну болест јетре у поређењу са BALB/c мишевима са доминантним Th2 имунским одговором који ће показати резистенцију на развој наведених метаболичких поремећаја.

Предложено истраживање има за циљ расветљавање имунометаболичких механизма у гојазности и повезаних метаболичких поремећаја коришћењем мишева са доминантним Th1 и Th2 имунским одговором у експерименталном моделу гојазности, што може бити од значаја у развоју нових терапијских приступа.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Користећи комплементарне експерименталне приступе у мишева са доминантним Th1 и Th2 одговором као и у генетски дефицијентних мишева у експресији ST2 и одговарајућих контрола, биће испитана улога Th1 и Th2 имунског одговора као и улога IL33/ST2 осовине у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре након индукције болести применом дијете са високим садржајем масти. Планираним истраживањем треба испитати могући механизам настанка стеатохепатитиса и имунометаболичких поремећаја.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже Проф. др Наду Пејновић, која је ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија. Проф. др Нада Пејновић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Молекулска медицина: имунологија, инфекција и инфламација

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Академик, проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета

медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

Закључак и предлог Комисије

Др мед. Немања Јовичић, асистент у настави на предмету Хистологија и ембриологија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, на основу досадашње стручне, научне и педагошке активности испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука и законом о универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Кандидат је овладао целуларним, молекуларним и хистолошким техникама савремених медицинских истраживања које су неопходне за израду ове теме.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже да наслов теме докторске дисертације буде измењен и да гласи **"Имунометаболички фенотип мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором у експерименталном моделу гојазности"**

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Немање Јовичића, под називом **" Имунометаболички фенотип мишева са доминантним тип 1 и тип 2 имунским одговором у експерименталном моделу гојазности "** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

2. Академик, проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
-

3. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
-

У Крагујевцу, 16.6.2015.године