

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

|              |              |
|--------------|--------------|
| Шифра        | 07. 10. 2020 |
| Организација |              |
| 05           | 8565         |

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

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-594/29 од 10.09.2020. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидаткиње др Милоша Станковића под називом:

### „Имуномодулаторни цитокини у каротидној болести“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;
2. **Проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан;
3. **Доц. др Весна Шкулетић**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Цитологија, 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

Доктор Милош Станковић рођен је у Крагујевцу 18. 01. 1978. године. Гимназију у Крагујевцу је завршио је 1996. године. Исте године је уписао Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, а основне студије медицине је од 2000. године наставио на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Дипломирао је школске 2003. Године на Медицинском факултету Универзитета у Београду са просечном оценом 9,34.

Од новембра 2006. године је стално запослен у Клиничком центру у Крагујевцу као клинички лекар, а од 2008. године као лекар на специјализацији из опште хирургије на Медицинском факултету у Београду. Од 2011. до 2012. године је похађао специјализацију из кардиохирургије на Медицинском факултету у Београду, а од 2013. је уписан на специјалистичке студије из опште хирургије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Током школске 1998/99. и 1999/2000. године учествовао је у настави на предмету Анатомија Медицинског факултета у Крагујевцу као студент-демонстратор. Школске 2013/2014. године изабран је у звање сарадник у настави за ужу научну област Хирургија. Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Тренутно је запослен на Факултету медицинских наука као истраживач приправник. Говори енглески језик.

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

**Наслов:** Имуномодулаторни цитокини у каротидној болести

**Предмет:** Одредити степен ткивне експресије, концентрације циркулишућих IL-33 и sST2 код пацијената са каротидном атеросклерозом и њихову повезаност са концентрацијама других цитокина у серуму и стадијумима каротидне атеросклеротске болести

**Хипотезе:**

1. Концентрације мерених цитокина у системској циркулацији код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији биће већи у односу на концентрације истих цитокина у серуму здравих особа.
2. Очекује се постојање позитивне корелације између ткивне експресије IL-33 и ST2 и прогресије атеросклеротског плака односно стадијума болести.
3. Број и заступљености CD68+ ћелија, биће у позитивној корелацији са стадијумом атеросклеротског процеса.
4. Очекује се постојање позитивне корелације између неких клиничких, хистолошких и биохемијских варијабли

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

Кандидат је као први аутор објавио један рад у целини у часопису категорије M23 на једном од водећих светских језика, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

**Stankovic M, Ljujic B, Babic S, Maravic-Stojkovic V, Mitrovic S, Arsenijevic N, Radak D, Pejnovic N, Lukic ML.** IL-33/IL-33R in various types of carotid artery atherosclerotic lesions. *Cytokine*. 2019;120:242-50. **M23**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Атеросклероза је хронична инфламацијска болест артеријских крвних судова, укључујући аорту, каротидне, коронарне и артерије екстремитета и водећи је узрок морбидитета и смртности у целом свету. Формирање атеросклеротског плака је сложен процес који укључује дисфункционални ендотел, депоновање холестерола, стварање пенстих ћелија, акумулацију макрофага и Т-лимфоцита у интими и медији као и пролиферацију глатко мишићних ћелија и фибробласта. Прогресија атеросклеротског плака може узроковати стенозу крвних судова или руптуру плака што за последицу има акутни инфаркт миокарда или појаву исхемијских неуролошких поремећаја.

Један облик атеросклерозе је каротидна болест, где инфламација пресудно учествује у развоју атеросклеротских плакова у каротидним артеријама. Упркос нагомиланим и све убедљивијим доказима који показују да инфламација игра кључну улогу у развоју атеросклеротске болести, прецизни молекулски и ћелијски механизми стварања каротидног плака и даље су недовољно разјашњени. Резултати бројних истраживања сугеришу: повезаност експресије различитих цитокина у самом атеросклеротском плаку, корелацију концентрација цитокина у серуму са степеном и прогресијом плака, клиничким исходима и стадијума атеросклеротске болести. Резултати студија показали су да концентрације циркулишућих биомаркера инфламације, као што су CRP (енг. C-reactive protein CRP), IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-18 имају предиктивни значај за будуће кардиоваскуларне догађаје, нестабилност каротидног плака и повећање дебљине каротидних плакова. Супротно томе, показано је да су повишене серумске концентрације имunosупресивног интерлеукин IL-10 као и IL-5 (Th2 интерлеукин) у позитивној корелацији са добрим исходом лечења пацијената са акутним коронарним синдромом.

IL-33 је члан фамилије IL-1 цитокина, заједно са IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-18. Ови цитокини показују снажне про-инфламацијске ефекте и строго су регулисани. Показано је да IL-1 $\beta$  и IL-18 промовишу атерогенезу код мишева, такође, примена антагониста рецептора за IL-1 (IL-1R $\alpha$ ) смањује величину атеросклеротске лезије код мишева. IL-33 се везује за свој рецептор (IL-33R) који постоји у два облика, трансмембрански (ST2L) и солубилни (sST2) рецептор. IL-33 секретују многе ћелије међу којима су и ендотелне, епителне, глатко-мишићне и имунске ћелије (14). IL-33 је мултифункционални цитокин који делује као транскрипциони фактор, алармин или показатељ хроничне инфламације. Током процеса апоптозе овај цитокин инактивишу каспазе спречавајући тако његово ослобађање што на концу има имunosупресивна дејства. Супротно, када се из некротичних или оштећених ћелија, ослободи IL-33 у ванћелијски простор он снажно утиче на поларизацију поларизацију Th2 или Th1 имунског одговора. Показано је да IL-33 директно активира NK, NKT and CD8+ T ћелије и тако утиче на појачану секрецију IFN- $\gamma$ . IL-33 учествује у патогенези аутоимунских, инфламацијских, алергијских, фибротичких и малигних поремећаја, тако што атенуира или промовише прогресију болести. Резултати студија показују да IL-33 успорава прогресију атеросклеротског плака у експерименталном моделу атеросклерозе, смањује степен гојазности и да поседује кардиопротективну улогу. Заштитна улога IL-33 у мишем моделу атеросклерозе остварена је поларизацијом из про-атерогеног Th1 у атеропротективни Th2 имунски одговор, што за резултат има повећану секрецију IL-5, продукцију антитела на ox-LDL и смањено стварање пенстих ћелија. У експерименталном моделу гојазности, егзогена апликација IL-33 повећала је удео ST2+Tregs што је за резултат имало мању инфламацију масног ткива и смањење резистенције на инсулин. Супротно томе, резултати недавно објављене студије показују да недостатак гена за IL-33 и ST2, не утичу на развој атеросклерозе у ApoE-дефицијентним мишевима.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

### **Значај истраживања**

Дакле, улога IL-33/ST2 сигналног пута, као и њихова улога у поларизацији имунског одговора у каротидној атеросклерози није у потпуности расветљена. У том смислу испитивање улоге сигналног пута IL-33/ST2 било од интереса за проучавање патофизиологије атеросклерозе каротидних артерија и помогло у развоју терпијских агенаса и биолошких маркера за дијагнозу и прогнозирање тока и исхода болести.

### **Циљ истраживања**

Одредити степен ткивне експресије као и концентрације циркулишућих IL-33 и sST2 код пацијената са каротидном атеросклерозом и повезаност ових параметара са серумским концентрацијама других релевантних цитокина и стадијумима каротидне атеросклерозе; Сагласно овом општем циљу постављени су следеће експериментални задатци:

1. одредити концентрације цитокина (IL-33, sST2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10 и IL-18) у системској циркулацији пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији и здравих особа подударних по полу и старости
2. дефинисати и квантификовати стадијуме атеросклеротских плакова код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији, одређивањем патохистолошких скорова за процену тежине болести
3. имунохистохемијским бојењима испитати ткивне експресије IL-33 и ST2 у узорцима атеросклеротског плака
4. дефинисати и квантификовати инфламамацијске промене у узорцима атеросклеротског плака, одређивањем броја и заступљености CD68<sup>+</sup> ћелија.
5. одредити концентрације биохемијских параметара у системској циркулацији пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији (CRP, холестерол, триглицериди, шећер...)
6. утврдити корелације између свих клиничких, хистолошких и биохемијских варијабли.

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

Показано је да су и IL-33 и ST2 експримовани у хуманим атеросклеротским плаковима. Резултати клиничких студија показали су да велике серумске концентрације IL-33 корелирају са већом стопом смртности код пацијената са инфарктом миокарда и елевацијом ST сегмента. Поред тога, повећане концентрације циркулишућег IL-33 након имплантације коронарног стента позитивно корелирају са рестенозом коронарног стента. Такође, детектована је и повезаност између концентрација IL-33 и тромботских компликација након руптуре плака и прогресије каротидне атеросклерозе код пацијената са реумагоидним артритисом.

## **2.7. Метод истраживања**

### **2.7.1 Врста студије**

## Клиничка опсервациона студија (кохортна студија)

### 2.7.2. Узорковање:

Истраживање ће бити спроведено на узорцима крви и серума добијених од пацијената са атеросклеротском стенозом каротидних артерија, који су подвргнути оперативном лечењу на Институту за кардиоваскуларне болести „Дедиње“, у складу са одобрењем Етичког Одбора ИКВБ Дедиње. У истраживање ће бити укључени сви узаstopни болесници код којих је спроведено хируршко лечење, током периода узимања узорака. Контролне групе ће чинити здраве особе, као и болесници са неатеросклеротским обољењем каротидне артерије.

Преоперативно ће сваки болесник бит подвргнут ултразвучном прегледу врата ради процене степена стенозе каротидних артерија. Преоперативно, на дан операције ће се узимати узорак крви свим болесницима. Рутинске лабораторијске анализама би обухватиле: комплетну крвну слику, са бројем леукоцита и леукоцитарном формулом, као и концентрације CRP-а, холестерола, триглицерида, урее и креатинина у серуму. Атеросклеротски плакови из каротидних артерија оболелих ће бити добијени током операције- ендартеректомијом каротидних артерија.

1. Пацијенти подвргнути каротидној ендартеректомији (n=200);
2. Пацијенти са неатеросклеротским обољењем каротидне артерије (n=15);
3. Контролна група-добровољни даваоци крви (n=33).

### 2.7.3. Варијабле које се мере у студији

**Независне варијабле:** Примарне независне варијабле су демографске карактеристике оперисаних пацијената и степен стенозе каротидне артерије

#### **Зависне варијабле:**

- АНА скор,
- серумске концентрације цитокина,
- концентрације биохемијских параметара,
- степен ткивне експресије IL-33 и ST2,
- интезитет мононуклеарне инфилтрације у атеросклеротском плаку

#### **Ултразвучна анализа степена каротидне стенозе**

Степен стенозе каротидних артерија биће одређен помоћу ултразвука, уз коришћење Доплеровог ефекта, ради процене брзине струјања крви у каротидним артеријама и мерења периферног отпора протоку крви. Оперативном лечењу ће бити подвргнути болесници са степеном стенозе каротидне артерије већим од 70%, према НАСЦЕТ критеријумима.

#### **Сакупљање узорака крви**

Крв ће бити узета преоперативно. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум ће се изоловати центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнути на  $-20^{\circ}\text{C}$  за даљу анализу.

#### **Одређивање биохемијских параметара:**

У серуму би се одређивали следећи биомаркери: холестерол, триглицериди, CRP, глюкоза, уреа и креатинин.

#### **Одређивање концентрација цитокина у серуму:**

Концентрације цитокина ((IL-33, sST2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10 и IL-18) у системској циркулацији биће мерене у серуму пацијената и здравих особа имуноензимски (ELISA) према унапред утврђеном протоколу (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### **Хистолошка бојења:**

Ткивни исечци атеросклеротског плака након фиксације формалдехидом и калупљењем у парафину биће бојени хематоксилином и еозином са циљем да се утврди локализација запаљенског инфилтрата, интезитет инфилтрације, дегенерација, некроза и степен атеросклеротског процеса. Микроскопирање исечака ткива атеросклеротског процеса биће одрађено употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером. За дефинисање и квантификовање стадијума атеросклеротског процеса (тип I, II, III, IV, V, VI) користиће се АНА скоринг систем (енгл. *American Heart Association Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis*, АНА) (34), а микроскопирање ће обавити два независна истраживача слепом методом. За процену стабилности палка биће коришћени следећи параметри:

1) стабилни плак (фиброзни и фиброатероматозни) су они који садрже малу количину липида, задебљалу фиброзну капу ( $> 65 \mu\text{m}$ ), мали степен инфламације без знакова компликације плака.

2) нестабилни плак (сви остали) су они који садрже велику количину липида, поља некрозе, инфламирану и танку фиброзну капу ( $< 65 \mu\text{m}$ ), експанзивно ремоделирање, хеморагију, неоваскуларизацију и калцификацију.

#### **Процена ткивне експресије IL-33 и ST2 и степена мононуклеарног инфилтрата у узорцима атеросклеротског плака применом имунохистохемијских техника:**

У циљу испитивања експресије IL-33 и ST2 и степена мононуклеарног инфилтрата користиће се имунохистохемијско бојење. Ткивни исечци атеросклеротског палка ће бити инкубирани са биотинисаним анти-хуамним антителима према IL-33, ST2, CD68 а визуелизација ће се омогућити помоћу Human Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a (Abcam). Дистрибуција позитивно пребојених IL-33 и ST2 ћелија, као и инфламацијских ћелија у атеросклеротским плаковима, биће праћена микроскопирањем ткивних исечака употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером.

#### **2.7.4. Снага студије и величина узорка**

Снага студије и одређивање величине узорка: Величина узорка је израчуната на основу средњих вредности серумских концентрација IL-33 (35). Средња вредност серумских концентрација IL-33 оболелих од системског лупуса еритематодуса била је  $164.1 \pm 110 \text{ pg/ml}$ , а здравих контролних особа  $23.3 \pm 8.75$ . Студијски узорак је израчунат узимајући да је вероватноћа грешке I типа ( $\alpha$ ) 0.05, а снага студије ( $\beta$ ) 0.8 за независни T тест, поредећи групе међу собом у оба смера, према статистичком програму G\*Power3 (24). На основу задатих параметара утврђено је за за дате критеријуме неопходан минималан узорак од 40 испитаника, односно 20 испитаника по групи здравих и оболелих. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни T 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.



### 2.7.5. Статистичка анализа

За обраду података користиће се статистички пакет SPSS 22.0. Пре статистичке обраде података, испитаће се правилност расподеле добијених вредности. Уколико вредности буду имале правилну расподелу користиће се параметарски Student-ов t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Све добијене вредности биће презентоване као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (SE) или као медијане (5., 25., 75. и 95. перцентил). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група је одређена на  $p < 0.05$ .

### 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Подаци из досадашње литературе указују да IL-33 у анималним моделима атеросклерозе заиста показује значајан утицај на ток и брзину прогресије атеросклеротског процеса. Међутим, у до сада доступној литератури недостају подаци о повезаности процеса атеросклерозе код људи, са IL-33. Како је до сада овај цитокин показао истинско плејоморфно дејство у имнуском одговору, очекује се и да у овом сложеном процесу какав је атеросклеротска болест његов утицај буде двосмеран. Ово истраживање би могло да пружи одређене одговоре не само о утицају овог појединачног цитокина на сложен атеросклеротски процес, већ и да укаже на потенцијалне могућности терапијских интервенција повезаних са улогом осовине IL-33/ST2 у атеросклеротским процесима.

### 2.9. Оквирни садржај дисертације

Предложено истраживање има за циљ да испита улогу и корелацију између концентрација имуномодулацијских цитокина и стабилности атеросклеротског плака код пацијената који су каротидној ендартеректомији. Основни циљ нашег истраживања је: мерење серумских концентрације и одређивање степена ткивне експресије IL-33 и sST2 у атеросклеротским плаковима код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији. Обзиром на комплексност атеросклеротског процеса, одређиваће се и концентрације других имуномодулаторних цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10, IL-18). Концентрације цитокина у серуму биће мерене имуноензимским тестовима (ELISA), а степен ткивне експресије методом имунохистохемије. Упркос бројним експерименталним доказима да инфламација игра суштинску улогу у патогенези атеросклерозе, прецизни молекулски и ћелијски механизми који су укључени у формирање атеросклеротског плака још увек су недовољно испитани. Такође,

результати досадашњих истраживања у којима су испитивани цитокини и њихова улога у процесу атеросклерозе, су опречни у погледу корелације мерених цитокина и стабилности атеросклеротског плака. С друге стране, улога IL-33 и sST2 у атеросклерози код људи била је предмет испитивања у ограниченом броју радова са контрадикторним резултатима.

Очекујемо да ће измерене концентрације испитиваних цитокина бити веће код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији у односу на контроле. Такође, се очекује да се детектује позитивна корелација између експресије IL-33 и sST2 молекула и стабилности каротидног атеросклеротског плака

### 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика. Проф. др Биљана Љујић испуњава услове за менторае докторских дисертација у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама. Истовремено поседујући одговарајуће стручне и научне компетенције које су у вези са предложеном темом.

#### 3.1. Компетентност ментора

##### Радови проф. др Биљана Љујић

1. Kovacevic MM, Pejnovic N, Mitrovic S, Jovicic N, Petrovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, **Ljujic B**. Galectin-3 deficiency enhances type 2 immune cell-mediated myocarditis in mice. *Immunol Res.* 2018;66:491-502.
2. Stankovic M, **Ljujic B**, Babic S, Maravic-Stojkovic V, Mitrovic S, Arsenijevic N, Radak D, Pejnovic N, Lukic ML. IL-33/IL-33R in various types of carotid artery atherosclerotic lesions. *Cytokine.* 2019;120:242-50.
3. Milovanovic M, Volarevic V, **Ljujic B**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. *Plos ONE.* 2012; 7:e45225.
4. Pavlovic S, Petrovic I, Jovicic N, **Ljujic B**, Miletic Kovacevic M, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33 reverts MLD-STZ Induction of Diabetes and Attenuate Insulinitis in Prediabetic NOD Mice. *Front Immunol.* 2018;9:2646.

5. Arsenijević S, **Ljujić B**, Stošić I, Grujičić D, Marinković D, Milošević- Djordjević O. Polymorphisms of the GSTT1 and GSTM1 genes in women of central Serbia-absence of association with uterine myoma. Arch Biol Sci. 2013;65:415-420.

### 3. Научна област дисертације

Медицина

### 4. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;
2. Проф. др Драгче Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан;
3. Доц. др Весна Шкулетић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Цитологија, члан;

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат др Милош Станковић испуњава све услове прописане Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука да приступи изради докторске дисертације.

Комисија је утврдила да се ради о предлогу оригиналног научног истраживања које има за циљ да одреди степен ткивне експресије, концентрације циркулишућих IL-33 и sST2 код пацијената са каротидном атеросклерозом и њихову повезаност са серумским концентрацијама других цитокина и стадијумом каротидне атеросклеротске болести. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др

Милоша Станковића: „Имуномодулаторни цитокини у каротидној болести“ и упуту у даљу административну процедуру одобравања њене израде.

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;

2. **Проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан;

3. **Доц. др Весна Шкулегић**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Цитологија, члан;

*Skuletic Vesna*

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ 2020. године