

Оцена готове докторске тезе,  
доставља .-

## НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ

На 542. седници Наставно-научног већа ВМА, одржаној 26. 4. 2012. године, одређена је комисија за оцену готове докторске тезе ВС *mr sc med* Биљане Драшковић-Павловић из Института за медицинска истраживања ВМА, чија тема гласи:

»ФУНКЦИОНАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИНФЛАМАТОРНИХ ГРАНУЛОЦИТА ПАЦОВА У УСЛОВИМА ТЕШКЕ ТЕРМИЧКЕ ПОВРЕДЕ«.

Комисија у саставу: ВС проф. др Драгана Вучевић, Институт за медицинска истраживања ВМА, ВС проф. др Данило Војводић, Институт за медицинска истраживања ВМА и проф. др Биљана Божић, Биолошки факултет Београд, проучила је детаљно приложени рад и подноси Наставно-научном већу следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### *1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ*

Докторски рад *mr sc med* Биљане Драшковић-Павловић написан је на 126 страна текста и подељен је на следећа поглавља: УВОД (34 стране), РАДНА ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ

ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ (13 страна), РЕЗУЛТАТИ (32 стране), ДИСКУСИЈА (24 стране), ЗАКЉУЧАК (1 страна) и ЛИТЕРАТУРА (21 страна). Резултати су документовани са 3 слике, 10 табела и 24 графика. У раду је цитирано 240 изворних литературних података.

## 2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У докторском раду кандидаткиње *mr sc med* Биљане Драшковић-Павловић представљени су резултати експерименталног истраживања, које је спроведено у оквиру НИ задатка "Имунорегулаторни механизми у инфламацији и зарастању ране". Тема истраживања припада области имунологије трауме и инфламације.

У **уводу** је дат опширан преглед досадашњих сазнања о утицају термичке повреде на функцију имунског система и улози гранулоцита у инфламацији. Познато је да термичка повреда, сразмерно интензитету и захваћеној површини, доводи до комплексних локалних и системских реакција. Локалне промене су последица локално насталог инфламаторног одговора, док се системска реакција карактерише повећањем метаболичког одговора читавог организма што чини проинфламаторни системски одговор. С друге стране, у оквиру системске реакције организма на термичку повреду развија се и антиинфламаторни одговор. Балансирани однос проинфламаторног и антиинфламаторног одговора води ка излечењу. Међутим, када организам не успе да успостави хомеостазу долази до развоја генерализованог, неконтролисаног инфламаторног одговора који је дефинисан као синдром системског инфламаторног одговора (СИРС). Поремећај функције ћелија имунског система, који настаје у СИРС - у, сматра се једним од кључних фактора у развоју фаталних инфекција и дисфункције виталних органа.

Гранулоцити су примарне ефекторне ћелије у урођеном имунском одговору. Већ у првим сатима након трауме, чак и без присуства инфективног агенса, циркулишући гранулоцити могу бити активирани и ослободити значајне количине супероксидног аниона. Са овим променама у активности гранулоцита поклапа се и динамика њиховог накупљања у неке од виталних органа, на првом месту плућа и јетру. Сматра се да је интраваскуларна

активација гранулоцита и екстрацелуларно накупљање слободних кисеоничних радикала пореклом из ових ћелија важан механизам посттрауматског оштећења ових органа. Након ране фазе активације гранулоцита развија се фаза смањења њихових ефекторских функција што се уклапа у описану посттрауматску анергију.

Данас знамо да гранулоцити продукују велики број цитокина: проинфламаторне цитокине, хемокине, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ . Хемокини MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  не привлаче само моноците и Т лимфоците, већ и незреле дендритичне ћелије (DC). Поред тога, и  $\alpha$ -дефензин, који се ослобађа током дегранулације гранулоцита, делује хемоатрактантно на Т лимфоците и незреле DC. Постоји пуно доказа да између гранулоцита и DC постоји комуникација и верује се да гранулоцити доприносе диференцијацији и активацији DC. Поред тога, подаци из литературе указују да гранулоцити могу да "усмере" диференцијацију макрофага у правцу про - или антиинфламаторног стања, да утичу на диференцијацију Б лимфоцита и продукцију имуноглобулина посредством солубилног стимулатора Б лимфоцита. Према томе, гранулоцити нису само ефекторне ћелије са микробицидном и фагоцитном функцијом, већ и ћелије које регрутују и регулишу активност других ћелија у инфламаторном одговору, учествују у матурацији DC и развоју Т и Б ћелијског одговора на месту инфламације.

Локално настале промене на кожи током термичке повреде имају карактеристике ране. Процес зарастања ране је комплексан и пролази кроз више фаза, а у раној, инфламаторној фази доминантне ћелије су гранулоцити.

До сада доступни подаци о функцији гранулоцита у термичкој повреди углавном се односе на гранулоците периферне крви. Инфламаторни гранулоцити у условима термичке повреде су много мање истраживани.

Због тога је на основу расположивих литературних података кандидаткиња формулисала следеће **радне хипотезе**:



1. Тешка термичка повреда инхибира адхезивност, апоптозу и оксидативни метаболизам инфламаторних гранулоцита, а стимулише продукцију азот оксида и проинфламаторних цитокина IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и MCP-1.
2. Ефекти термичке повреде на функције инфламаторних гранулоцита су последица:
  - а. Активације/инхибиције ензимских система укључених у унутарћелијски пренос сигнала у овим ћелијама;
  - б. Деловања локално продукованих медијатора у зони опечене регије.

За проверу ових хипотеза дефинисани су следећи **циљеве истраживања**:

На експерименталном моделу термичке повреде пацова испитати фенотипска и функционална својства инфламаторних гранулоцита:

1. Експресију мембранских молекула - CD11b, CD18, CD80, CD86, МНСII класе, ICAM-1
2. Адхезивна својства и улогу  $\beta$ 2 интегрина и цитоскелета у тим процесима
3. Путеве преноса унутарћелијских сигнала укључених у адхезивне процесе
4. Апоптозу и корелацију овог процеса са експресијом bcl-2 молекула
5. Оксидативни метаболизам
6. Продукцију азот оксида
7. Продукцију цитокина - IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и MCP-1.

У поглављу ***Материјал и методе*** кандидаткиња је јасно и детаљно представила дизајн истраживања, начин припреме суспензије ћелија и тестове који су примењени за проверу постављених хипотеза. У експериментима су коришћени генетски високосродни сојеви пацова *Albino Oxford*, мужјаци, телесне масе 200 – 220 гр, који су гајени у стандардним условима у виваријуму Института за медицинска истраживања ВМА. Експериментална и контролна група су јасно дефинисане. За процену функционалних карактеристике инфламаторних гранулоцита примењени су релевантни имунолошки тестови.

У обради података коришћен је дескриптивни статистички метод, а значајност разлике између испитиваних група или параметара тестирана је Студентовим Т тестом и тестом парова. Статистичка значајност је прихваћена на нивоу  $p < 0.05$ .

Добијени резултати показују да инфламаторни гранулоцити животиња изложених термичкој повреди испољавају снижен капацитет везивања за артефицијелну подлогу и нижи степен хомотипске агрегације (ХА) у поређењу са контролним животињама. Инхибиција адхезивних својстава није условљена разликом у експресији CD11b/CD18 молекула, који представља кључни адхезивни молекул гранулоцита. Краткотрајном култивацијом гранулоцита у присуству фармаколошког стимулатора форбол миристат ацетата (РМА) показано је да инфламаторни гранулоцити животиња изложених термичкој повреди имају очувану способност ослобађања CD11b/CD18 молекула из интрацелуларних депоа и испољавања овог молекула на површини ћелије. У том смислу, нису нађене разлике у одговору на РМА између контролних и животиња изложених термичкој повреди.

Резултати који су добијени у тесту ХА указују на постојање различитих сигналних механизма, који су укључени у ХА инфламаторних гранулоцита животиња које су изложене термичкој повреди у поређењу са контролом. Такође, резултати приказани у овом раду показују инхибицију апоптозе инфламаторних гранулоцита у условима термичке повреде. Инхибиција апоптозе није повезана са експресијом Bcl-2 молекула и продукцијом азот оксида (NO). Како је инхибиција апоптозе детектована и у популацији гранулоцита периферне крви, добијени резултати указује на системски ефекат термичке повреде на апоптозу гранулоцита. Поред тога, и локално продуковани медијатори у зони опечене регије доприносе инхибицији апоптозе инфламаторних гранулоцита с обзиром да је показан значајан антиапоптотски ефекат ексудата из ране опечених животиња на гранулоците периферне крви (и опечених и интактних животиња).

Инфламаторни гранулоцити животиња изложених термичкој повреди показују снижен капацитет стварања реактивних кисеоничних интермедијера. Истовремено, ове ћелије

имају већи потенцијал продукције NO у поређењу са гранулоцитима контролних животиња. Такође, у 24-часовној култури ових ћелија детектује се више проинфламаторних цитокина IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ , али и имунорегулаторног цитокина IL-10 у поређењу са контролом.

### 3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу *Дискусија* кандидаткиња је врло детаљно и критично коментарисала добијене резултате у светлу постојећих литературних података и резултата других студија о улози гранулоцита у термичкој повреди, показавши сву своју зрелост и велико познавање проблематике коју је изабрала за своје изучавање. Насупрот литературним подацима, који говоре о повећаном накупљању и активацији гранулоцита у плућима и јетри рано након термичке повреде, резултати који су представљени у докторском раду *mr sc med* Биљане Драшковић-Павловић показују смањен прилив и снижен адхезивни капацитет гранулоцита из ране која зараста у условима термичке повреде у поређењу са контролом. Такође, резултати овог рада указују на разлике у унутарћелијском сигналном механизму и функционалном капацитету инфламаторних гранулоцита животиња које су изложене термичкој повреди у поређењу са контролним животињама.

Комисија сматра да резултати приказани у овом раду представљају оригиналне резултате, који указују на различито понашање гранулоцита у различитим ткивима након термичке повреде и у том смислу представљају допринос постојећим сазнањима о функционисању гранулоцита у термичкој повреди. Посебно бисмо истакли резултате који се односе на продукцију IL-10, цитокина са имунорегулаторном функцијом, што у контексту нових сазнања о постојању супресорних ћелија пореклом од мијелоидних ћелија отвара нова питања о хетерогености популације гранулоцита, која мигрира на место оштећења ткива у термичкој повреди. Такође, истакли бисмо да експериментални модел субкутано имплантираног сунђера, који је коришћен у овом раду, представља врло захвалан модел за даља истраживања начина локалне модулације активности гранулоцита са потенцијалним деловањем на процес репарације ткива оштећеног опекотинском повредом.



4. РАДОВИ И САОПШТЕЊА У КОЈИМА СУ ОБЈАВЉЕНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ:

А. Радови у целости

1. **Draskovic-Pavlovic B, Vucevic D, Bozic B, Majstorovic I, Colic M.** Functional properties of granulocytes after thermal injury. *Immunol Res.* **2012** Apr;52(1-2):133-8..
2. Žunić G., Šupić G., Magić Z., **Dražković B., Vasiljevska M.** Increased nitric oxide formation followed by increased arginase activity induces relative lack of arginine at wound site and alters whole nutritional status in rats almost within the early healing period. *Nitric Oxide* **2009**; 20: 253-58.

Б. Радови штампани у изводу

1. **Draskovic-Pavlovic B, Vucevic D, Bozic B, Vasiljic S, Colic M.** Different function of MAPK in the homotypic aggregation of thermal injury activated neutrophils in vitro. in *International Immunology* **2010**; vol 22 (Suppl. 1): ii87 (PP-034-20).
2. G. Žunić, G. Šupić, **B. Pavlović-Dražković, M. Vasiljevska.** **2009.** Time course alterations of nitric oxide metabolism and inducible gene expression at the wound site during an early healing period in rats. *Abs W-C069 in Clin Chem Lab Med 47, Special Supplement, ppS1-S409.*
3. **Draskovic-Pavlovic B, Vucevic D, Majstorovic I, Gasic S, Bozic B, Colic M.** Inhibition of wound granulocyte apoptosis during burn injury in rats. in *Maced J Med Sci* **2008**, 1(Suppl.1): S28.
4. **Draskovic-Pavlovic B, Kataranovski M, Bozic B, Colic M.** Wound granulocyte adhesiveness during burn injury in rats: modulation by cytochalasin B. *16<sup>th</sup> European Congress of Immunology and 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris 2006. Abstract Book p471, abs.34.*

## Закључно мишљење и предлог:

Докторска теза *BC mr sc med* Биљане Драшковић-Павловић под насловом »ФУНКЦИОНАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИНФЛАМАТОРНИХ ГРАНУЛОЦИТА ПАЦОВА У УСЛОВИМА ТЕШКЕ ТЕРМИЧКЕ ПОВРЕДЕ« представља оригинални научни рад из области експерименталне имунологије. Истраживање у овом раду је спроведено у складу са свим принципима научноистраживачког рада. Рад је написан јасно, систематично, студиозно и целовито. Добијени резултати истраживања, који могу имати и клинички значај, доприносе фундаменталним сазнањима о улози гранулоцита у термичкој повреди. Квалитет добијених резултата потврђен је и њиховим објављивањем у водећим међународним часописима. Стога, чланови Комисије једногласно закључују да докторска теза *BC mr sc med* Биљане Драшковић-Павловић испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, те као таква представља значајан допринос проучавању дате проблематике. С обзиром да кандидаткиња испуњава све законске услове за одбрану рада, са великим задовољством предлажемо Наставно - научном већу ВМА да овај рад прихвати као завршну докторску тезу и омогући њену јавну одбрану.

Београд, 16. Јул 2012.

Чланови комисије:

BC проф. др Драгана Вучевић

BC проф. др Данило Војводић

Проф. др Биљана Божић