

Наставно-научном већу Медицинског факултета у Фочи Универзитета у Источном Сарајеву

Предмет: Извештај комисије о подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације

Одлуком Научно-наставног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-85 од 12.12.2019., именована је комисија за оцјену научне заснованости и подобности теме и кандидата др Горана Поповића за израду докторске дисертације под називом “Антиинфламацијски и имуномодулацијски ефекти валпроичне киселине, карбамазепина и ламотригина” у следећем саставу:

1. Академик Миодраг Чолић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет Фоча, предсједник Комисије,
2. Проф. др Дејан Бокоњић, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет Фоча, члан Комисије,
3. Проф. др Драгана Вучевић, ужа научна област имунологија, Медицински факултет Универзитета одбране Београд, члан Комисије
4. Доц. др Биљана Милинковић, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет Фоча, члан Комисије
5. Доц. др Душан Михајловић, ужа научна област Медицинска хемија, Медицински факултет Фоча, члан Комисије и ментор

Комисија је прегледала пријаву теме докторске дисертације и о томе подноси Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву следећи

ИЗВЈЕШТАЈ

О НАУЧНОЈ ЗАСНОВАНОСТИ И ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ И КАНДИДАТА ЗА ИЗРАДУ

ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Назив и сједиште факултета: Медицински факултет Фоча

Податак о матичности факултета за научну област из које припада дисертација:

Научна област: медицинске и здравствене науке

Научно поље: Основна медицина

Ужа научна област: Педијатрија

Податак да је факултет имао организоване магистарске студије из научне области којој припада дисертација:

Интегрисани студијски програм медицине

Основни биографски подаци о кандидату и његовом стручном раду

Поповић Горан је рођен 21.09.1983.године у Требињу гдје је завршио основну и средњу медицинску школу. Школске 2001/2002 године проглашен је за ђака генерације, а 2002. године уписује Медицински факултет у Фочи. Дипломирао је са просјечном оцјеном 9,24 (девет двадесет четири). Године 2008. проглашен је за најбољег студента завршне године студија, а 2009. добио је признање од стране Коморе доктора медицине за најбоље резултате постигнуте на студију медицине. Године 2015. положио је специјалистички испит из педијатрије. Ради као педијатар у Универзитетској болници Фоча, а укључен је и у допунској настави Медицинског факултета у Фочи. Завршио је једномјесечну едукацију из основних имунолошких метода у Институту за медицинска истраживања, Војномедицинске академије (ВМА) у Београду.

Подобност кандидата да одговори на постављени предмет, циљ, задатке и хипотезе

Др Горан Поповић је на основу претходног ангажовања у научно-истраживачкој дјелатности Факултета показао детерминисаност и таленат за бављење научно-истраживачким радом. О томе говори и озбиљан предлог за израду докторске дисертације у којој је јасно указано на научни проблем, јасно су постављени циљеви и хипотезе истраживања. Планирана методологија у највећој мјери може допринијети разријешењу научног проблема и у потпуности одговорити на постављене циљеве и хипотезе истраживања. Кандидат је подобан за израду докторске дисертације и има јасну визију о важности доприноса овог истраживања развоју његове каријере, повећања квалитета научног истраживања на Факултету и развоју науке уопште.

Назив дисертације: Антиинфламацијски и имуномодулацијски ефекти валпроичне киселине, карбамазепина и ламотригина

Научна област/Ужа научна област: педијатрија

Медицинске и здравствене науке/Молекуларна медицина

Предмет и значај истраживања: предмет истраживања ове докторске дисертације је антиинфламацијско и имуномодулацијско дејство антиепилептика валпроичне киселине, карбамазепина и ламотригина на функцију хуманих неутрофилних гранулоцита и моноклеарних ћелија периферне крви (ПБМНЦ) здравих испитаника ин витро. Нова научна сазнања указују да инфламација има значајну улогу у развоју и перзистенцији епилептичких пражњења. Циљни рецептори великог броја антиепилептика се експримирају и на ћелијама имунског система, што указује на потенцијално имуномодулацијско дејство ових лијекова. ГАБАА рецептори преко којих дјелује валпроична киселина се експримирају на појединим ћелијама имунског система као што су хумани моноцити, ткивни макрофаги, ЦД4+ Т-лимфоцити и неутрофили. Никотински рецептори преко којих дјелује карбамазепин су експримирани на Т- лимфоцитима, али и на осталим имунским ћелијама. Такође, карбамазепин преко бензодиазепинских рецептора експримираних на неутрофилима остварује своје ефекте на хемотаксу ових ћелија ин витро. Рецептори глутамата (НМДА) преко којих дјелује ламотригин се експримирају на ЦД4+ Т-лимфоцитима, дендритским ћелијама, макрофагима и неутрофилима. Иако су нека истраживања показала да антиепилептици могу да модификују имунски одговор, подаци су углавном противријечни. Наиме, често је тешко разликовати ефекте антиепилептика и ефекте самих епилептичких напада на имунски систем. Антиепилептици могу утицати како на хуморални тако и на целуларни имунски одговор модификујући експресију и синтезу цитокина. Овај ефекат би могао бити последица директног дејства антиепилептика у модулацији активности појединих фактора транскрипције посебно нуклеарног фактора каппа Б (НФ-кБ).

Најбројније популације леукоцита периферне крви код људи су неутрофилни гранулоцити, лимфоцити и моноцити. Хумани неутрофили периферне крви имају просјечни пречник од 7-10 μm , једро им је сегментирано, а цитоплазма испуњена гранулама и секреторним везикулама. Постоје три основна типа гранула у неутрофилима које се формирају током њиховог сазријевања. Азурофилне грануле (познате и као пероксидаза-позитивне или примарне грануле) су највеће и садрже мијелопероксидазу (МПО) али и дефензине, лизозиме, БПИ (енгл. бацтерицидал/пермеабилиту-инцреасинг протеин) и серин протеазе: неутрофилну еластазу (НЕ), протеиназу 3 (ПР3) и катепсин Г (ЦГ). Други тип гранула, специфичне (или секундарне) грануле, су мање, не садрже МПО, а карактерише их присуство гликопротеина лактоферина. Ове грануле такође садрже доста антимикробних супстанци као што су НГАЛ (енгл. неутрофил гелатинасе асоциатед липоцалин), хЦАП-18 (енгл. хуман цатхелицидин протеин) и лизозим. Трећи тип, желатиназне (терцијарне) грануле, такође су МПО-негативне садрже бројне металопротеиназе,

попут желатиназе и леуколизина. Након активације, неутрофили производе реактивне кисеоничне врсте у процесу који се зове респираторни или оксидативни прасак. Такође, након активације могу да уђу у НЕТозу, активну форму ћелијске смрти која се одликује ослобађањем декондензованог хроматина у екстрацелуларни простор. Влакнасте структуре које се називају неутрофилне екстраћелијске замке (NET; енгл. неутропхил ехтрацеллулар трапс) садрже хистоне и антимикробне протеине пореклом из цитоплазме и из гранула као што су лактоферин, ЦГ, дефензини, ЛЛ-37 (продукт разградње хЦАП-18), НЕ, ПРЗ, МПО и желатиназа. Ек виво је показано да НЕТ-ови могу да “хватају” и убијају многе микроорганизме излажући их високим концентрацијама антимикробних супстанци.

Двије највеће популације моноклеарних ћелија периферне крви чине лимфоцити и моноцити. Најбројнији лимфоцити периферне крви су Т лимфоцити који могу бити ЦД4+ и ЦД8+ фенотипа. Описан је већи број субпопулација ефекторских ЦД4+ Т лимфоцита од којих су најбоље проучене Тх1, Тх2, Тх17 и регулаторни Т лимфоцити (Трег).

Кључни цитокин који продукују Тх1 лимфоцити је ИФН- γ који подстиче фагоцитну и микробицидну активност макрофага, диференцијацију наивних ЦД4 Т лимфоцита у Тх1, а истовремено инхибира настанак Тх2 и Тх17 лимфоцита. Тх2 лимфоцити секретују ИЛ-4 који индукује ИгЕ хуморални одговор, ИЛ-5 који активира еозинофиле и ИЛ-13 који заједно са ИЛ-4 учествује у алергијским реакцијама и у одбрани од паразита. Тх17 лимфоцити продукују неколико цитокина од којих је најзначајнији ИЛ-17А. Овај цитокин стимулише продукцију хемокина и цитокина који на мјесту запаљења регрутују неутрофиле и моноците као и продукцију антимикробних супстанци као што су дефензини. Такође, Тх17 лимфоцити, осим ИЛ-17, продукују ИЛ-21 и ИЛ-22. Тх17 лимфоцити су такође важни у патогенези многих инфламацијских болести, као што су псоријаза, запаљенске болести црева, реуматоидни артритис и мултипла склероза. Главна улога Трег лимфоцита је супресија имунског одговора и одржавање толеранције на сопствене антигене. Трег лимфоцити продукују ИЛ-10 и ТГФ- β , који делују доминантно супресорски.

Публикације о ефектима антиепилептика на ћелије имунског система, посебно на неутрофилне гранулоците, су малобројне. Полазећи од оригиналног приступа које ће бити примењен у овом истраживању, очекује се да добијени резултати поставку даља истраживања у овом научном подручју и можда постану основа за проширење терапијских индикација за примену антиепилептика.

На основу ученог научног проблема, кандидат је поставио следеће хипотезе:

Хипотезе докторске дисертације

- 1) Антиепилептици (валпроична киселина, карбамазепин и ламотригин) инхибирају функцију хуманих неутрофилних гранулоцита и моноклеарних ћелија периферне крви ин витро.
- 2) Због многобројних циљних рецептора на које дјелује, ефекат валпроичне киселине је израженији у односу на карбамазепин и ламотригин.

Циљеви и задаци у дисертацији

За провјеру ових хипотеза постављени су сљедећи циљеви истраживања:

Испитати утицај различитих концентрација валпроичне киселине, карбамазепина и ламотригина на:

- 1) Оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних форбол-12-миристат-13-ацетатом (ПМА), опсонизованим зимозаном (ОпЗу), Н-Формул-Мет-Леу-Пхе (фМЛП) и калцијум јонофором (ЦаИ).
- 2) Интензитет НЕТозе хуманих неутрофила периферне крви стимулираним деловањем ПМА и ЦаИ.
- 3) Степен апоптозе хуманих нестимулисаних неутрофила и неутрофила стимулираних деловањем ПМА, ОпЗу, фМЛП и ЦаИ.
- 4) Пролиферацију мононуклеарних ћелија периферне крви (ПБМНЦ) стимулираних фитохемаглутинином (ПХА).
- 5) Т хелпер (Тх) поларизацију имунског одговора у култури ПБМНЦ стимулираних са ПХА.
- 6) Продукцију проинфламацијских цитокина у култури ПБМНЦ стимулираних деловањем ПХА.

Aktuelnost i podobnost teme doktorske disertacije

Predložena doktorska disertacija bavi se ispitivanjem imunomodulatornog efekta antiepileptika na ćelije imunskog sistema, limfocite, monocite i neutrofile. Prema dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju valproične kiseline i lamotrigina na funkciju humanih neutrofila. Podaci o dejstvu antiepileptika na funkciju limfocita su nešto brojniji. Pokazano je da u punoj krvi zdravih donora stimuliranih TSST-1 (engl. toxic shock syndrome toxin), valproična kiselina dovodi do smanjenja sekrecije IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- α i IL-22. Takođe, u istoj studiji je pokazano da karbamazepin smanjuje sekreciju IL-1 β , IL-2, TNF- α , a povećava sekreciju IL-22. Valproična kiselina u koncentraciji od 100 ug/ml značajno smanjuje produkciju TNF- α i IL-6 u kulturi humane monocitne ćelijske linije (THP-1) inhibicijom NF-kappaB signalnog puta. Isti autori su pokazali odsustvo značajnog efekta karbamazepina na ovaj transkripcioni faktor. Sve je više studija koje se bave antitumorskim efektom valproične kiseline prema različitim hematološkim malignitetima. Ispitivanjem efekta valproata na dvije linije leukemijskih ćelija (HL-60 - humana promijelocitna leukemija i MOLT-4 - humana T-limfocitna leukemija) in vitro, utvrđeno je da valproat stimuliše diferencijaciju, inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu ovih ćelija. U nekoliko studija je istaknuto da valproična kiselina ispoljava svoju antitumorsku aktivnost posredstvom nekoliko mehanizama kao što su: inhibicija histonske deacetilaze, aktivacija ERK-AP1 signalnog puta, inhibicija

protein kineze C (PKC), negativna regulacija Wnt signalnog puta, aktivacija familije peroksizom proliferišućih receptora (PPAR). Nije poznato da li neki od ovih mehanizama leži u osnovi imunomodulacijskog dejstva valproične kiseline. Zbog svega navedenog, predložena tema je vrlo aktuelna.

Pregled stanja u području istraživanja (kod nas i u svijetu)

Kao što je ranije istaknuto publikacije o efektima antiepileptika na ćelije imunskog sistema su malobrojne. Kada je riječ o granulocitima jedina publikacija se odnosi na karbamazepin. Naime, pokazano je da ovaj antiepileptik inhibira hemotaksu humanih neutrofila zdravih donora, indukovanu fMLP-om i LPS-om in vitro. Međutim, karbamazepin nema efekat na spontanu migraciju neutrofilnih granulocita, kao ni na indeks i učestalost fagocitoze. Prema dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju valproične kiseline i lamotrigina na funkciju humanih neutrofila.

Podaci o dejstvu antiepileptika na funkciju limfocita su nešto brojniji. Pokazano je da u punoj krvi, zdravih donora stimulisanih TSST-1 (engl. toxic shock syndrome toxin), valproična kiselina koncentracije 100 µg/ml dovodi do smanjenja sekrecije IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- α i IL-22. Karbamazepin smanjuje sekreciju IL-1 β , IL-2, TNF- α , a povećava sekreciju IL-22. Takođe je pokazano da karbamazepin ne utiče na proliferaciju humanih perifernih limfocita u kulturi.

Pokazano je da valproična kiselina, kao inhibitor enzima histonske deacetilaze, ispoljava imunomodulatorni efekat na humanim dendritskim ćelijama (DC) in vitro. Tokom procesa diferencijacije humanih monocita periferne krvi u DC in vitro, valproična kiselina u koncentraciji od 0.5 mM stimuliše sekreciju IL-6, a inhibira sekreciju IL-10 i IL-8. Tokom procesa maturacije DC u istim uslovima valproična kiselina dovodi do smanjenja ekspresije CD40, CD80 i CD83 molekula, kao i smanjenja sekrecije IL-10 i IL-12. Takođe, u ko-kulturi DC tretiranih valproičnom kiselinom i CD4+ T limfocita zapažena je manja proliferacija ovih limfocita u odnosu na kontrolu. Isti autori su uočili efekat valproične kiseline na plazmocitoidne DC in vitro. Valproična kiselina dovodi do smanjenja produkcije IFN- γ , TNF- α i IL-6 u kulturi ovih ćelija. U ko-kulturi plazmacitoidnih DC tretiranih valproičnom kiselinom i CD4+ limfocita bila je manja proliferacija i sekrecija IFN- γ u odnosu na kontrolu. Takođe je pokazana povećana zastupljenost IL-10+CD4+ limfocita u tim kokulturama. Ovi podaci ukazuju da valproična kiselina inhibicijom histonske deacetilaze slabi funkciju humanih DC i povećava potrebu za praćenjem imunskih funkcija pacijenata koji koriste valproičnu kiselinu kao terapiju. Takođe, pokazano je da valproična kiselina djelovanjem inhibicijski na histonsku deacetilazu ispoljava immunosupresivno dejstvo tako što inhibira litičku aktivnost NK ćelija prema leukemijskim ćelijama in vitro, na dozno zavisani način.

O efektima lamotrigina na funkciju granulocita, limfocita i drugih ćelija imunskog sistema nema podataka u literaturi.

Značaj istraživanja sa stanovišta aktuelnosti u određenoj naučnoj oblasti

Na osnovu dosadašnjih rezultata istraživanja, prema dostupnoj literaturi, nema podataka o efektu valproične kiseline i lamotrigina na funkciju neutrofila, a podaci o delovanju ovih lekova na funkciju limfocita, posebno o mehanizmu njihovog imunomodulatornog delovanja su malobrojni. U ovoj studiji je planirano ispitivanje uticaja antiepileptika valproične kiseline, karbamazepina i lamotrigina na funkcionalnu aktivnost humanih limfocita periferne krvi (Th polarizaciju i produkciju citokina) i neutrofilnih granulocita (oksidativni prasak i intenzitet netoze) in vitro. S obzirom da ova istraživanja do sada nisu rađena, dobijeni rezultati će predstavljati originalni doprinos u ovoj oblasti i doprineće boljem razumevanju imunomodulacijskih efekata pomenutih lekova.

Veza sa dosadašnjim istraživanjima

Do sada je objavljeno nekoliko publikacija o imunomodulacijskom efektu antiepileptika, ali nije u potpunosti razjašnjen mehanizam njihovog dejstva. H. Himmerich i saradnici su pokazali da u punoj krvi, zdravih donora stimulisanih TSST-1 (engl. toxic shock syndrome toxin), valproična kiselina koncentracije 100 µg/ml dovodi do smanjenja sekrecije IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- α i IL-22. Karbamazepin smanjuje sekreciju IL-1 β , IL-2, TNF- α , a povećava sekreciju IL-22. Naisbit i saradnici su pokazali da karbamazepin ne utiče na proliferaciju humanih limfocita periferne krvi u kulturi.

Ichiyama i saradnici su pokazali da valproična kiselina u koncentraciji od 100 µg/ml značajno smanjuje produkciju TNF- α i IL-6 u kulturi humane monocitne ćelijske linije (THP-1) posredstvom inhibicije NF-kappaB aktivacionog puta. Isti autori su pokazali odsustvo značajnog efekta karbamazepina na ovaj transkripcioni faktor.

Kada je riječ o granulocitima jedina publikacija (Caldiroli i saradnici) se odnosi na karbamazepin. Naime, pokazano je da ovaj antiepileptik inhibira hemotaksu humanih neutrofila zdravih donora, indukovanu fMLP-om i LPS-om in vitro. Međutim, karbamazepin nema efekat na spontanu migraciju, kao ni na indeks i učestalost fagocitoze.

Metode istraživanja i instrumenti (oprema)

U istraživanju će se koristiti sledeća metodologija:

1. Izolacija i kultivacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMNC) iz krvi dobrovoljnih davalaca u koju je dodat antikoagulans K3EDTA. Nakon nalivanja na Limfoprep gradijent (Sigma; gustina 1.077 g/ml) krv će biti centrifugirana na 2200 rpm, 20 min na sobnoj temperaturi. Potom će ćelije biti centrifugirane na 900 rpm, 10 minuta na sobnoj temperaturi u tri navrata. Dobijene ćelije u interfaznoj zoni (prstenu) biće iskorišćene za postavljenje kultura.

2. Izolacija neutrofila iz krvi dobrovoljnih davalaca kojoj je kao antikoagulans dodat K3EDTA. Nakon sedimentacije ćelija sa 3% rastvorom dekstrana 20 minuta biće izdvojena plazma obogaćena leukocitima. Takva plazma biće pažljivo nanijeta na površinu limfocitnog separacionog gradijenta, a nakon centrifugiranja (2200 rpm, 20 minuta na sobnoj temperaturi) izdvojiće se sediment u kome se nalaze granulociti i eritrociti. Eritrociti će biti lizirani pomoću pufera za liziranje (amonijum hlorid). Na kraju će granulociti biti resuspendovani u HBSS puferu (Hank's balanced salt solution) bez Ca i Mg. Vijabilnost ćelija će biti utvrđena brojanjem ćelija u 0,2% rastvoru Tripan plavog. Ovako dobijeni granulociti biće korišćeni prema potrebama eksperimenta.

3. Mjerenje intenziteta oksidativnog praska neutrofila metodom hemiluminiscencije pomoću luminola: granulociti (predominantno neutrofili) ($2 \times 10^5/200\mu\text{l}$) će biti kultivisani u HBSS+ medijumu (HBSS+ Ca+Mg + 0.5% inaktivisani humani serum + 10mM HEPES (1M)), a zatim tretirani sa različitim koncentracijama antiepileptika (valproat: 2 mM – 1 mM - 0,5 mM, karbamazepin: 50 $\mu\text{g/ml}$ – 25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, lamotrigin: 100 mM – 50 mM - 25 mM) i luminolom (50 μM (Serva, Germany)). Nakon jednočasovne inkubacije ćelije će biti stimulisane različitim stimulusima (PMA (50nM); opsonizovani zymosan (10 $\mu\text{g/ml}$); fMLP (1 μM); CaI (1 μM)). Odmah nakon stimulacije pomoću hemiluminiscentnog spektrometra (Synergy HT, BIO-TEK) počće mjerenje intenziteta emitovane svjetlosti koji je proporcionalan sintetisanim reaktivnim kiseoničnim vrstama.

4. Mjerenje intenziteta NEToze metodom fluorescence na spektrofotometru: granulociti ($2 \times 10^5/200\mu\text{l}$) će biti inkubirane sa različitim koncentracijama antiepileptika (kao što je gore navedeno) i u HBSS+ medijumu. Nakon jednočasovne inkubacije ćelije će biti stimulisane sa PMA (50 nM) i sa CaI (1 μM). U pojedine bazene, biće dodat 1% TritonX100. Nakon tročasovne inkubacije biće dodata fluorescentna boja Sitox green u finalnoj koncentraciji 500 nM, a nakon toga će biti očitani rezultati na fluorimetru. Intenzitet fluorescence je direktno proporcionalan stepenu NEToze.

5. MTT test se zasniva na sposobnosti ćelijskog enzima NADH-dehidrogenaze da redukuje tetrazolijomovu so (3-(4,5-dimetiltiazol-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) u formazan koji se akumulira u mitohondrijama. Formazan formira ljubičaste precipitate čija količina korelira sa brojem živih ćelija i intenzitetom proliferacije. Izolovane PBMNC ($3 \times 10^5/200\mu\text{l}$) biće inkubirane sa različitim koncentracijama valproične kiseline (2 mM, 1 mM, 0.5 mM); karbamazepina (50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$) ili lamotrigina (50 mM, 25 mM, 12.5 mM). Nakon tridesetominutne inkubacije sa antiepilepticima ćelije će biti stimulisane sa PHA u finalnoj koncentraciji od 30 $\mu\text{g/ml}$. Po završetku inkubacije od 72h u ćelijske kulture će biti dodat MTT u finalnoj koncentraciji od 0.5 mg/ml, a potom inkubirane 4 h na 37 oC. U sledećem koraku precipitat formazana biće rastvoren dodavanjem 1% rastvora SDS-HCL (Natrijum dodecil sulfat - hlorovodonična kiselina), a nakon rastvaranja biće izmjerena apsorbanca na 570 nm. Ovaj test će biti iskorišćen na identičan način za procjenu citotoksičnosti ispitivanih antiepileptika na nestimulisanim granulocitima. Na osnovu stepena MTT aktivnosti biće procjenjivana proliferativna sposobnost PBMNC.

6. Određivanje produkovanih citokina: efekat tretmana antiepilepticima na produkciju pro-inflamacijskih citokina i Th citokina u ćelijskim kulturama biće procjenjen kvantifikacijom citokina u supernatantu sedamdesetdvočasovnih PBMNC kultura, stimulisanih sa PHA u finalnoj koncentraciji 30 $\mu\text{g/ml}$.

Koncentracije citokina u supernatantu ćelijskih kultura: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-17, IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-12, IL-23 i TGF- β biće određene upotrebom komercijalnih ELISA kitova, prema uputstvima proizvođača.

Očekivani rezultati doktorske disertacije

Očekuje se da će valproat, karbamazepin i lamotrigin ispoljiti dozno-zavisan efekat na funkcionalni odgovor humanih PBMNC in vitro što će biti manifestovano inhibicijom proliferacije T limfocita, supresijom Th1 i Th17 odgovora kao i produkcije pro-inflamacijskih citokina, povećanjem Th2 i Treg odgovora. Pored toga, očekuje se da će ovi antiepileptici, primjenjeni u opsegu imunosupresivnih koncentracija, smanjiti nivo oksidativnog praska i intenzitet netoze u kulturi neutrofila periferne krvi stimulisanih PMA, zimozanom, fMLP-om ili Cal-om.

Procjena potrebnog vremena izrade disertacije, mjesto istraživanja

Istraživanje će biti rađeno u Centru za biomedicinske nauke, na Medicinskom fakultetu u Foči, Univerziteta u Istočnom Sarajevu. Za odobravanje studije pribaviće se saglasnost Etičkog Komiteta Medicinskog fakulteta u Foči. Mononuklearne ćelije i neutrofilni će biti izolovani iz periferne krvi dobrovoljnih davalaca. Nakon toga slijedi obrada podataka uz statističku analizu, kao i izrada pisane verzije doktorske disertacije, što će sve ukupno trajati godinu dana (12 mjeseci).

Podaci o komisiji

Ime nastavnika predloženog za mentora, zvanje, institucija u kojoj je stekao najviše zvanje, uža naučna oblast

Doc.dr Dušan Mihajlović, uža naučna oblast Medicinska hemija, Medicinski fakultet Foča

Najmanje 5 naučnih radova – bibliografskih jedinica koje se odnose na temu doktorske disertacije (za mentora):

Mihajlovic D, Vucevic D, Chinou I, Colic M. Royal jelly fatty acids modulate proliferation and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. Eur Food Res Technol 2014; 238: 881–887.

Mihajlovic D, Rajkovic I, Chinou I, Colic M. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells. Journal of Functional Foods 2013;5:838-846.

Čolić M, Mihajlović D, Mathew A, Naseri N, Kokol V. Citocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. Cellulose 2015;22:763-778.

Tomić S, Janjetović K, Mihajlović D, Milenković M, Kravić-Stevović T, Marković Z, Todorović-Marković B, Spitalsky Z, Micusik M, Vučević D, Čolić M, Trajković V. Graphene quantum dots suppress proinflammatory T cell responses via autophagy-dependent induction of tolerogenic dendritic cells. *Biomaterials* 2017;146:13-28.

Thorne A, Tomić S, Pavlović B, Mihajlović D, Džopalić T, Čolić M. Tumour necrosis factor- α promotes survival and phenotypic maturation of Poly (I:C) – treated dendritic cells, but impairs their Th1- and Th17 polarizing capability. *Cytotherapy*, 2015;17:633-646.

Imena ostalih članova komisije, zvanja, institucije u kojoj je stekao najviše zvanje i uža naučna oblast

1. Akademik Miodrag Čolić, uža naučna oblast Imunologija, Medicinski fakultet Foča, predsjednik Komisije,
2. Prof. dr Dejan Bokonjić, uža naučna oblast Pedijatrija, Medicinski fakultet Foča, član Komisije,
3. Prof. dr Dragana Vučević, uža naučna oblast imunologija, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane Beograd, član Komisije
4. Doc. dr Biljana Milinković, uža naučna oblast Pedijatrija, Medicinski fakultet Foča, član Komisije

Najmanje 3 naučna rada – bibliografske jedinice koje se odnose na temu doktorske disertacije (za članove komisije):

Akademik Miodrag Čolić, uža naučna oblast Imunologija, red. prof. Medicinski fakultet u Foči

Čolić M, Tomić S, Bekić M. Immunological aspects of nanocellulose. *Immunol Lett.* 2020;222:80-89.

Čolić M, Mihajlović D, Mathew A, Naseri N, Kokol V. Citocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 2015;22:763-778.

Čolić M, Džopalić T, Tomić S, Rajković J, Rudolf R, Vuković G, Marinković A, Uskoković P. Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells. *Carbon.* 2014;67:273-87.

Prof.dr Dragana Vučević, uža naučna oblast imunologija, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Tomić S, Joksimović B, Bekić M, Vasiljević M, Milanović M, Čolić M, Vučević D. Prostaglandin-E2 Potentiates the Suppressive Functions of Human Mononuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells and Increases Their Capacity to Expand IL-10-Producing Regulatory T Cell Subsets. *Front Immunol* 2019;10:475.

Tomić S, Ilić N, Kokol V, Gruden-Movsesijan A, Mihajlović D, Bekić M, Sofronić-Milosavljević L, Čolić M, Vučević D. Functionalization-dependent effects of cellulose nanofibrils on tolerogenic mechanisms of human dendritic cells. *Int J Nanomedicine* 2018;13:6941-6960.

Ristic L, Dakovic D, Postic S, Lazic Z, Bacevic M, Vučević D. Clinical Characteristics of Abutment Teeth with Gingival Discoloration. *J Prosthodont.* 2019;28:e45-e50.

Prof. dr Dejan Bokonjić, uža naučna oblast pedijatrija, Medicinski fakultet Foča, član komisije

1. Ismaili B, Bokonjic D. Short-term low-level laser therapy attenuates inflammation and production of interleukin -1, but elevates the level of matrix metalloproteinase 9 in chronic periodontitis. *Journal of International Dental and Medical Research.* 2014. Vol. 7. (1) 1-7. ISSN 1309-100X.

2. Bokonjic D, Bajic T, Mijovic B, Jankovic S, Masic S. Assessment of quality of life in children suffering from asthma. June 21-24, 2018. *Pediatric Pulmonology.* Vol 53. Supplement 1. Page 97. ISSN. 8755-6863.

3. Bokonjic D, Stojnic N, Colic M, Mihajlovic D, Vasilijic S, Minic P, Vučević D. Impaired neutrophil extracellular traps formation in children suffering from cystic fibrosis. 14th International Congress on Pediatric Pulmonology – CIPP XIV. Krakow, Poland, June 25-28, 2014. Poster presentation. Congress proceedings- supplement of *Pediatric Pulmonology.*

Doc.dr Biljana Milinković, uža naučna oblast pedijatrija, Medicinski fakultet Foča, član komisije:

1. Milinković B, Bokonjić D, Gavrilović Elez T, Čančar V, Avram N, Zapaljenske bolesti srca kod djece, *Biomedicinska istraživanja* br 2 Vol 10, 2019g

2. Milinković B, Bokonjić D, Joksimovic B, Kulić V, Šupić V, Karakteristike urinarnih infekcija u djece do 7 godina. *Biomedicinska istraživanja:* 2018;9(1):1-9UDK: 616.61-002-08-053.2

3. Milinković B, Bokonjic D., Učestalost i struktura anomalija urotrakta i ožiljnih promjena na bubrezima poslije prve febrilne IUT., Usmeno saopštenje. Prvi Kongres pedijatarata RS. Knjiga sažetaka. Str 89. Teslić 2016g

Podaci o prijavljivanju – neprijavljivanju teze

Dr Goran Popović nije prijavljivao na drugoj visokoškolskoj ustanovi doktorsku disertaciju pod naslovom “Antiinflamacijski i imunomodulacijski efekti valproične kiseline, karbamazepina i lamotrigina”.

Reference koje je kandidat koristio za prijavu teze:

1. Alam S., Laughton D, Walding A., Wolstenholme A. (2006) Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Molecular Immunology* 43: 1432–1442.

2. Arbez J., Lamarthee B., Gaugler B., Saas P. (2014) Histone deacetylase inhibitor valproic acid affects plasmacytoid dendritic cells phenotype and function. *Immunobiology*, 219 (8): 637-643
3. Bai X., Xu C., Wen D., Chen Y., Li H., Wang X., Zhou L., Huang M., Jin J. (2018) Polymorphisms of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and cluster of differentiation 36 (CD36) associated with valproate-induced obesity in epileptic patients. *Psychopharmacology*, 235(9): 2665-2673.
4. Barišić N. (2009) Farmakoterapija. U: N. Barišić i suradnici. *Pedijatrijska neurologija*: 952-970
5. Beghi E., Shorvon S. (2011) Antiepileptic drugs and immune system. *Epilepsia* 52: 40-44
6. Boldyrev A.A., Bryushkova E.A., Vladychenskaya E.A. (2012) NMDA receptors in immune Competent Cells. *Biochemistry* 77 (2) : 128 – 134
7. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33 (5): 657-670
8. Blaheta R., Cinatl J. (2002) Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Medicinal Research Reviews* , 22(5): 492-511
9. Caldiroli E., De Ponti F., Cosentino M., Marino F., Fietta A.M., Taddei M., Tartara A., Zibbeti A., Mazzone A., Lecchini S., Frigo G.M. (1997) Carbamazepine affects neutrophil function through an action on peripheral benzodiazepine receptors. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 19(3): 367-382
10. Campbell D. (2015) Control of regulatory T cell migration function, and homeostasis. *The Journal of Immunology*, 195 (6): 2507–2513.
11. Carvalho L., Aquino E., Neves A., Fontes W. (2015) The neutrophil nucleus and its role in neutrophilic function. *Journal of Cellular Biochemistry*: 116(9): 1831-1836
12. Cook A., Zafar M., Mathias S., Stewart A., Albuja A., Bensalem-Owen M., Kapoor S., Baumann R. (2015) Pharmacokinetics and clinical utility of valproic acid administered via continuous infusion. *CNS Drugs*, 30 (1): 71–77
13. Cowland J., Borregaard N. (2016) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews*, 273 (1): 11–28
14. Crome S. Q., Wang A. Y., Levings M. K. (2010) Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 159 (2): 109–119
15. El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., J.C. Marie., M.A. Gougerot-Pocidaló, P.M. Chan Dang (2016) Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews*, 273 (1): 180–193

16. Faurschou M., Borregaard N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5 (14): 1317–1327
17. Forsyth R., Newton R. (2018) *Paediatric neurology*. Oxford University Press: 304-306
18. Frikeche J., Simon T, Brissota E., Grégoire M., Gauglerd B., Mohtya M. (2012) Impact of valproic acid on dendritic cells function. *Immunobiology*, 217 (7): 704-710
19. Gagliani N., Huber S. (2017) Basic aspects of T helper cell differentiation. In *T-Cell Differentiation*. Humana Press, New York, NY: 19-30
20. Gierbolini J., Giarratano M., Benbadis S. (2016) Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*: 885-888
21. Godhwani N., Bahna S. (2016) Antiepilepsy drugs and the immune system. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 117 (6): 634-640
22. Himmerich H, Bartsch S., Hamer H., Mergl R., Schönherr J., Petersein C., Munzer A., Clifford Kirkby K., Bauer K., Sack U. (2013) Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro. *Journal of Psychiatric Research*, 47 (11): 1751-1759
23. Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S.(2000) Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B. *Brain Research*, 857 (1-2): 246–251.
24. Jorch S., Kubes P. (2017) An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature medicine*, 23 (3): 279-287
25. Kaczorowski M., Jutel, M. (2013) Human T regulatory cells: on the way to cognition. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(3): 229-236
26. Kolaczowska E., Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13: 159-175
27. Kunisawa N., Shimizu S., Kato M., Iha H.A., Iwai C., Hashimura M, Ogawa M., Kawaji S., Kazuma K., Abe K., Ohno Y. (2018) Pharmacological characterization of nicotine-induced tremor: responses to anti-tremor and anti-epileptic agents. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137 (2): 162-169
28. Lacy P. (2005) The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology & Therapeutics*, 107 (3): 358 – 376
29. Liu S., Liang B., Jia H., Jiao Y., Pang Z., Huang Y. (2017) Evaluation of cell death pathways initiated by antitumor drugs melatonin and valproic acid in bladder cancer cells. *FEBS Open Bio* 7 (6): 798–810
30. Metzler K., Fuchs T., Nauseef W., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., Wahn V., Papayannopoulos V., Zychlinsky A. (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 117(3): 953-959

31. Naisbitt D., Farrell J., Wong G., Depta J., Dodd C., Hopkins J., Gibney C., Chadwick D., Pichler Pirmohamed M., Park K. (2003) Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (6): 1393-1403
32. Nauseef W.N., Borregaard N. (2014) Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7): 602-608
33. O'Garra A., Robinson D. (2004) Development and function of T helper 1 cells. *Advances in Immunology*, Academic Press, 83: 133-162
34. O'Garra A., Arai N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology*, 10 (12): 542-550.
35. Okoye I. S., Wilson M.S. (2011) CD4+ T helper 2 cells – microbial triggers, differentiation requirements and effector functions. *Immunology*, 134 (4): 368–377
36. Pacheco R., Gallart T., Lluís C., Franco R. (2007) Role of glutamate on T-cell mediated immunity. *Journal of Neuroimmunology* 185: 9–19.
37. Patsalous P., Lousis E. (2018) *The epilepsy prescriber's guide to antiepileptic drugs*. Cambridge University Press, Third Edition: 138
38. Placek K., Coffre M., Maiella S., Bianchi E., Rogge L. (2009) Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation. *Immunology*, 127 (2): 155–162
39. Ram V.R., Kher G.J., Dubal K.L., Pandya G.P., Joshi H.S. (2011) Development and validation of a stability indicating HPLC assay method for determination of lamotrigine in tablet formulation. *Pelagia Research Library Der Chemica Sinica*, 2 (2): 58-65
40. Řezáčová M., Vávrová J., Vokurková D., Zášková D. (2006) Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 25: 65-79.
41. Riva G., Cilibrasi C., Bazzoni R., Cadamuro M., Negroni C., Butta V., Strazzabosco M., Dalprà L., Lavitrano M., Bentivegna A. (2018) Valproic acid inhibits proliferation and reduces invasiveness in glioma stem cells through Wnt/ β catenin signalling activation. *Genes* 9 (11): 522
42. Rosenberg G. (2007) The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (16): 2090 – 2103
43. Shi X., Li M., Cui M., Niu C., Xu J., Zhou L., Li W., Gao Y., Kong W., Cui J., Hu J., Jin H. (2016) Epigenetic suppression of the antitumor cytotoxicity of NK cells by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *American Journal of Cancer Research*, 6(3): 600–614.
44. Steinborn B., Zarowski M., Winczewska-Wiktor A., Wojcicka M., Młodzikowska-Albrecht J, Losy J. (2014) Concentration of Il-1b, Il-2, Il-6, TNFa in the blood serum in children with generalized epilepsy treated by valproate. *Pharmacological Reports* 66(6): 972–975

45. Stockinger B., Veldhoen M. (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology*, 19(3):281–286
46. Torchinsky M.B., Blander J.M. (2010) T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(9): 1407–1421
47. van Rees D., Szilagyi K., Kuijpers T.W., Matlung H.L., van den Berg T.K. (2016) Immunoreceptors on neutrophils. *Seminars in Immunology*. Academic Press, 28 (2): 94-108
48. Zhu J., Yamane H., Paul W.E. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28: 445-489.

ЗАКЉУЧАК

Кандидат виши асистент др Горан Поповић испуњава све услове да се може бавити научно-истраживачким радом, а предложена теза у потпуности посједује све елементе потребне за научно-истраживачки рад. Комисија предлаже Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву да прихвати приједлог пројекта докторске дисертације под називом “Антиинфламацијски и имуномодулацијски ефекти валпроичне киселине, карбамазепина и ламотригина” кандидата др Горана Поповића.

Фоча, Мај, 2020.год.

Чланови комисије:

Академик, проф. др Миодраг Чолић

Проф. др Дејан Бокоњић

Проф. др Драгана Вучевић

Доц. др Биљана Миљинковић

Доц. др Душан Михајловић