

3
4
5 ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

6
7 I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:

8
9 1. Датум и назив органа који је именовео комисију: Наставно-научно веће Факултета
10 ветеринарске медицине, 177. седница од 31.05.2017. године

11
12
13 2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива
14 уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив
15 факултета, установе у којој је члан комисије запослен:

16 - Др Иван Б. Јовановић, редовни професор, биохемија, 2011, Факултет
17 ветеринарске медицине Универзитета у Београду

18 - Др Светлана Милановић, доцент, биохемија, 2013, Факултет ветеринарске
19 медицине Универзитета у Београду

20 - Др Весна Илић, научни саветник, 2013, Институт за медицинска истраживања
21 Универзитета у Београду

22
23
24 II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

25
26 1. Име, име једног родитеља, презиме: ЈЕЛЕНА (БОРИВОЈ) БЈЕЛИЦА

27
28 2. Датум рођења, општина, Република: 29.03.1976., Шабац, Србија

29
30 3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:

31
32 4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:

33
34 III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: „Утицај дефицита селена и блокатора
35 дејодиназа на урођени и стечени имунски одговор јувенилних пацова“

36
37
38 IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,
39 шема, графикона и сл.): Докторска дисертација је написана на 167 страна и садржи
40 следећа поглавља: Увод (4 стране), Преглед литературе (43 стране), Циљ и задаци
41 истраживања (1 страна), Материјал и методе рада (14 страна), Резултати истраживања
42 (42 страна), Дискусија (32 страна), Закључци (3 стране), Литература (27 страна са 327
43 референци), Скраћенице (1 страна). Дисертација је документована са укупно 35 табела,
44 15 слика у оквиру којих је 24 графикона. У поглављу Преглед литературе не налазе се
45 табеле и слике, поглављу Материјал и методе рада 4 табеле и једна слика са 3
46 графикона и поглављу Резултати истраживања 31 табела и 14 слика са 21 графиконом.
47 На почетку тезе се налазе наслов тезе и кратак садржај на српском и енглеском језику,
48 а на крају тезе је кратка биографија кандидата.

49
50
51 V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак
52 опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака
53 истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):

54
55 У поглављу „Увод“ кандидат наводи да су се од момента препознавања селена као
56 есенцијалног микронутријента научна сазнања његовом значају и улогама у организму
57 људи и животиња знатно проширила. Селен у облику аминокиселине селеноцистеин

1 улази у састав селеноензима, протеина које карактерише специфичан начин синтезе,
2 зависност од нивоа расположивог селена и хијерархијски регулисана експресија. Ови
3 протеини су диференцијално експримирани и у ћелијама и ткивима имунског система.
4 Јодотиронин дејодиназе су селеноензими са централном улогом у активацији и
5 инактивацији тиреоидних хормона, те тако представљају везу између селена и
6 тиреоидног статуса. Иако је синтеза дејодиназе у условима дефицита селена
7 приоритетна, механизам регулације њихове експресије нивоом селена није у
8 потпуности објашњен, али је специфичан за ткиво/орган и карактерише га хијерархија и
9 унутар саме суперфамилије ових ензима. Тиреоидни хормони имају кључну улогу у
10 расту, развоју, диференцијацији и метаболизму ћелија и ткива, те је и очекивано и
11 показано да њихов измењени статус утиче на имунски одговор. У специфичним
12 условима, ћелијски захтеви за тиреоидним хормонима могу бити измењени и њихов
13 ниво се у неким ткивима може и локално контролисати активношћу дејодиназа, што не
14 мора да прати промена нивоа хормона у циркулацији. Већина ранијих истраживања
15 указује на минимално присуство дејодиназа у ћелијама имунског система, али
16 експресија ових ензима може и преко нивоа тиреоидних хормона утицати на системску
17 расположивост селена за синтезу других селенопротеина, укључујући и оне укључене у
18 имунске одговоре и инфламацију. Поред тога, новији подаци указују и на могућност
19 индуковане експресије дејодиназа у одређеним популацијама имунских и других врста
20 ћелија. И поред препознатог утицаја статуса селена на функцију свих компоненти
21 имунског система, његова имуномодулаторна улога и механизми путем којих се она
22 остварује још увек нису довољно објашњени. Такође, с обзиром на комплексност
23 међусобних и то двосмерних интеракција, разумевање односа неуроендокриног и
24 имунског система још увек је непотпуно. Кандидат у закључку наглашава да ће даљим
25 проширивањем знања о улогама селенопротеина постати јаснији механизми помоћу
26 којих селен директно или индиректно утиче на различите физиолошке или
27 патофизиолошке процесе у области имунитета. Испитивање утицаја специфичних
28 блокатора (инхибитора) дејодиназе типа 1 и дејодиназе типа 2 на имунски статус у
29 комбинацији са дефицитом селена би, кроз праћење параметара неспецифичног,
30 хуморалног и ћелијског имунитета, могло указати на механизам интеракције тиреоидног
31 статуса и статуса селена у регулацији функције имунског система.

32 У поглављу „Преглед литературе“, кандидат је проучавао обимну литературу домаћих
33 и страних аутора од важности за изучавање ове проблематике. Кандидат је преглед
34 литературе систематизовао у четири главна потпоглавља. Прво и друго потпоглавље
35 се односе на селен, а треће и четврто на тиреоидне хормоне. Прво и треће
36 потпоглавље обрађују литературне податке о физиолошким улогама селена односно
37 тиреоидних хормона и начину на који их остварују, док друго и четврто детаљно описују
38 њихов утицај и утицај њиховог измењеног статуса на различите компоненте и функције
39 имунског система. У првом потпоглављу, кандидат износи најновије доступне податке о
40 селенопротеинима, специфичностима и регулацији њихове синтезе, затим о
41 селенопротеому са посебним освртом на глутатион пероксидазе и јодотиронин
42 дејодиназе и са описом њихових основних карактеристика и биолошких улога у
43 организму. У другом потпоглављу о селену су свеобухватно приказани доступни
44 литературни подаци о утицају селена на компоненте урођеног и стеченог имунитета.
45 Статус селена утиче на квалитет имунског одговора на различите антигене, са
46 генерално супримираним одговором у условима његовог дефицита, при чему
47 забележени ефекти зависе и од врсте антигена/имуногена. У селендефицичним
48 подручјима се бележи већа учесталост неких инфективних болести, а дефицит селена
49 се повезује и са обољењима у чијој основи је аутоимуна реакција или хронична
50 инфламација. Кандидат је приказао најновије податке о експресији различитих
51 селенопротеина у ћелијама имунског система који указују на њену хијерархијску
52 контролу у зависности од нивоа расположивог селена, али и од типа ћелије, нивоа
53 њене диференцијације и статуса активације. Дат је детаљан и обиман преглед
54 литературних података о утицају селена на компоненте урођеног имунитета (макрофаги
55 и НК ћелије) и стеченог имунитета (Б и Т лимфоцити, укључујући хуморални имунски
56 одговор), са акцентом на утицај нутритивног дефицита селена. Ефекат селена на
57 функцију макрофага испитиван је кроз утицај на способност фагоцитозе, оксидативни
58 капацитет, микробицидно дејство, миграторне способности, као и понашање ових
59 ћелија у инфламаторној реакцији. Једна од основних функција селенопротеина је
60 уклањање оксиданаса и заштита редокс осетљивих биолошких процеса, па је један од

1 начина на који селен остварује свој ефекат регулација продукције и нивоа ROS,
2 укључених у ћелијску сигнализацију и микробицидно деловање. Активност глутатион
3 пероксидазе, ензима који има улогу у уклањању пероксида је код макрофага једна од
4 највиших у поређењу са другим ткивима, а дефицит селена је значајно редукује.
5 Дефицит селена генерално има проинфламаторни ефекат и утиче на способност
6 ћелија за адхеренцу, кроз различите механизме какви су повећана активација NFκB,
7 повећана експресија COX2, утицај на активност матриксних металопротеиназа. Селен
8 утиче на цитолитичку активност NK ћелија и то вероватно стимулацијом експресије
9 рецептора за IL-2, која је дозно зависна. Даље, кандидат даје преглед резултата
10 бројних истраживачких радова у којима је испитиван утицај дефицита или надокнаде
11 селена на хуморални имунски одговор, и констатује да утицај селена (пре свега код
12 његове надокнаде) није конзистентан и зависи од различитих фактора, укључујући
13 узраст и врсту животиње, врсту коришћеног антигена, величину примењене дозе,
14 хемијски облик селена и претходни нутритивни статус јединке. Ефекат суплементације
15 селена на продукцију специфичних антитела не прати увек иста промена у нивоу
16 укупних имуноглобулина истог изотипа и селен не мора на исти начин деловати на
17 различите изотипове имуноглобулина. Литература описује и негативан утицај дефицита
18 селена на релативну заступљеност популације B ћелија слезине. Статус селена и ниво
19 експресије селенопротеина утичу у различитом интензитету и на заступљеност
20 популације T лимфоцита у периферним лимфатичним органима, на експресију
21 рецептора за IL-2, ћелијски редокс статус пре активације и капацитете за
22 пролиферацију T лимфоцита у одговору на митогене. У трећем потпоглављу, које се
23 односи на хормоне тиреоидне осовине, најпре је описана повезаност са селеном преко
24 његовог утицаја на синтезу хормона и њихов метаболизам, механизам деловања
25 тиреоидних хормона и остваривања њихових геномских и негеномских ефеката, као и
26 основне карактеристике антитиреоидних лекова коришћених у огледу
27 (пропилтиоурацил и јопаноична киселина) и начин на који остварују своје дејство.
28 Четврто потпоглавље детаљно обрађује у литератури доступне податке о утицају
29 тиреоидног статуса на компоненте и функцију имунског система. Најпре су описани
30 резултати добијени у истраживањима на анималним моделима са генски условљеним
31 дефицитом тиреоидних хормона или њихових рецептора, који потврђују доминантан
32 утицај дефицита ових хормона на популацију пре свега B, али и T лимфоцита. У овом
33 делу је описано и да TSH и TRH могу имати имуномодулаторно дејство и то директно,
34 преко сопствених рецептора експримираних на неким популацијама и субпопулацијама
35 имунских ћелија, или индиректно контролом нивоа тиреоидних хормона. Кандидат
36 даље описује утицај измењеног тиреоидног статуса узрокованог тиреоидектомијом или
37 применом антитиреоидних лекова на појединачне компоненте урођеног имунитета
38 (макрофаги и NK ћелије) и стеченог имунитета (B и T лимфоцити), укључујући утицај на
39 хуморални имунски одговор. Описано је да тиреоидни статус може да утиче на M1/M2
40 поларизацију макрофага, затим на однос субпопулација ових ћелија у перитонеалној
41 дупљи мишева пре и након индукције инфламације, као и на миграцију моноцита на
42 место инфламације. Тиреоидни хормони могу утицати и на оксидативни метаболизам
43 макрофага, а литература описује стимулаторни, инхибиторни или изостанак утицаја
44 измењеног тиреоидног статуса на продукцију водоник пероксида, који између осталог
45 зависи и од начина на који је стимулисана продукција ROS. Тиреоидни хормони у
46 физиолошком опсегу доза стимулишу активност NK ћелија, а хипотиреоза узрокована
47 применом PTU утиче на релативну заступљеност и апсолутни број NK ћелија у слезини.
48 Популација B лимфоцита је посебно осетљива на системску хипотиреозу и то
49 првенствено на нивоу прогениторских ћелија већ опредељених за B лозу, при чему је
50 највероватније угрожена њихова пролиферација. Испитивања утицаја тиреоидектомије
51 на титар антитела показују смањење примарног хуморалног одговора, док се након
52 примене PTU у зависности од периода примене и величине дозе бележе стимулација,
53 инхибиција или изостанак ефекта на титар антитела у примарном и секундарном
54 хуморалном одговору. Тиреоидни статус утиче и на популацију T лимфоцита,
55 вероватно и индиректно утицајем на факторе микросредине укључене у развој ове
56 популације ћелија на нивоу тимуса. Тиреоидектомија доводи до инволуције тимуса,
57 слезине и лимфних чворова, а примена T4 до њиховог обнављања. Примена PTU је
58 повећавала процентуалну заступљеност популације T лимфоцита у слезини, али
59 смањила њихов апсолутни број, док су подаци о утицају на субпопулације ових ћелија и

- 1 њихов однос контрадикторни. Хипотиреоза негативно утиче на митогенима стимулисану
2 пролиферацију Т и Б лимфоцита *in vitro*.
- 3 У поглављу „Циљ и задаци истраживања“ кандидат концизно и јасно наводи основне
4 циљеве истраживања који се састоје у испитивању утицаја дефицита селена и примена
5 инхибитора дејодиназа, самостално или у комбинацији, на параметре урођеног и
6 стеченог имунитета код јувенилних пацова. У оквиру тог циља, постављени су следећи
7 задаци:
- 8
- 9 1. Да се утврди статус селена одређивањем концентрације селена у пуној крви и
10 одређивањем активности глутатион пероксидаза 1 (из крви) и 3 (из крвне плазме)
 - 11 2. Да се утврди статус тиреоидних хормона одређивањем концентрација Т3, Т4 и TSH
 - 12 3. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код
13 селенадекватних и селендефицилних пацова на функционалне параметре урођеног
14 имунитета, одређивањем продукције пероксида код перитонеалних макрофага.
 - 15 4. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код
16 селенадекватних и селендефицилних пацова на функционалне параметре урођеног
17 имунитета, одређивањем капацитета за адхеренцу перитонеалних макрофага.
 - 18 5. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код
19 селенадекватних и селендефицилних пацова на целуларност лимфоидних органа,
20 одређивањем укупног броја леукоцита слезине.
 - 21 6. Да се утврди релативна заступљеност и апсолутни број популација Т и Б лимфоцита
22 и NK ћелија у слезинама селендефицилних пацова, и селенадекватних и
23 селендефицилних пацова уз примену инхибитора дејодиназа.
 - 24 7. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код
25 селенадекватних и селендефицилних пацова на титар природних антитела.
 - 26 8. Да се утврди утицај дефицита селена и утицај инхибитора дејодиназа код
27 селенадекватних и селендефицилних пацова на функционалне параметре стеченог
28 имунитета, одређивањем примарног (IgM) и секундарног (IgG) имунског одговора на
29 антигене овчијих еритроцита.
 - 30 9. Да се изврши статистичко уопштавање добијених резултата.
- 31
- 32 У поглављу „Материјал и методе“ кандидат је прегледно и детаљно описао
33 експериментални поступак, методе испитивања као и статистичке методе коришћене за
34 обраду резултата. Оглед је изведен на укупно 128 Wistar пацова мушког пола, старих 21
35 дан, подељених у осам једнаких група од по 16 јединки. Формиране су следеће огледне
36 групе: 1. Se+PTU-IA-, 2. Se+PTU-IA+, 3. Se+PTU+IA-, 4. Se+PTU+IA+, 5. Se-PTU-IA-, 6.
37 Se-PTU-IA+, 7. Se-PTU+IA- и 8. Se-PTU+IA+. Селенадекватна група (група 1),
38 нетретирана блокаторима (Se+PTU-IA-), током огледа је посматрана као контролна
39 група. Групе са ознаком Se+ (1, 2, 3 и 4) су добијале храну за пацове која је садржала
40 0,334 mg селена по килограму хране, а групе са ознаком Se- (5, 6, 7 и 8) су храњене
41 селендефицилном храном (0,031 mg селена/kg хране). Групе 3,4,7 и 8 (PTU+) су преко
42 воде за пиће добијале пропилтиоурацил (PTU). Концентрација PTU у води за пиће је
43 била 150 mg/L, а групе са ознаком PTU - су напајане водом за пиће без додатог PTU.
44 Јединкама из група 2, 4, 6 и 8 (IA+) је сваких седам дана интраперитонеално
45 апликована јопаноична киселина у дози 6 mg/100 g t.m. Током огледа су сваких седам
46 дана вршена контролна мерења телесне масе пацова. Након две недеље од почетка
47 експеримента, половини јединки из сваке од 8 експерименталних група (n=8) је
48 изазвана стерилна инфламација једнократном интраперитонеалном апликацијом 12 mL
49 тиогликолатног медијума. Третиране јединке су 7 дана након апликације тиогликолата,
50 увођене у етарску анестезију, након чега је од сваке кардијалном пункцијом узето 3-5
51 mL крви у хепаринисане епрувете (15 IU хепарина/mL крви). Из дела ове крви издвојена
52 је плазма центрифугирањем у трајању од 20 min, брзином од 1000 x g. Пуна крв је
53 коришћена и за одређивање статуса селена, а плазма је послужила за дефинисање

1 статуса хормона тиреоидне осовине одређивањем концентрације хормона T3, T4 и
2 TSH. У плазми је одређиван и титар IgM и IgG антитела на овчије еритроците. Од истих
3 животиња су, након узимања крви, поступком перитонеалне лаваже изоловани
4 макрофаги којима је испитивана способност адхеренце и продукције пероксида.
5 Друга половина пацова из сваке експерименталне групе је двократно
6 интраперитонеално имунизована са 0,5 mL 10% суспензије овчијих еритроцита
7 (енглески: *sheep red blood cells*, SRBC) у стерилном физиолошком раствору. Прва
8 имунизација је спроведена 32. дана огледа, а друга након 15 дана (47. дан огледа). У
9 циљу процене примарног имунског одговора, пет дана након прве имунизације
10 животињама је из репне вене извађена крв, из које је изолована плазма која је до
11 анализа чувана на -20°C. По истеку седам недеља експеримента, 3 дана након друге
12 имунизације, пацови су увођени у етарску анестезију, након чега им је кардијалном
13 пункцијом узимана крв и из дела крви издвајана плазма. Део плазме је замрзнут на -
14 20°C и у тим узорцима је одређиван титар антитела на овчије еритроците. У крви ових
15 животиња одређиван је и статус селена и хормона тиреоидне осовине, испитивањем
16 истих параметара као и након 3 недеље огледа.
17 Од жртвованих пацова изоловане су слезине. Слезине су анализирани на укупну
18 целуларност, као и процентуалну заступљеност Т и Б лимфоцита и NK ћелија методом
19 проточне цитометрије, и израчунаван је њихов апсолутни број. За одређивање
20 концентрација T3 и T4 коришћени су комерцијални RIA китови (ИНЕП, Земун). За
21 одређивање концентрације TSH у плазми огледних животиња коришћен је RIA кит (MP
22 Biomedicals, Белгија). Концентрација селена у пуној крви пацова је одређивана
23 хидридним техником на атомском апсорпционом спектрофотометру. Испитивање
24 активности ензима глутатион пероксидаза (GPx) вршена је куплованим тестом по
25 GÜNZLER-у и сар. (1974). На описани начин су добијени подаци о тиреоидном статусу и
26 статусу селена након 3 и 7 недеља огледа. Код изолованих перитонеалних макрофага
27 испитиван је капацитет за адхеренцу и продукцију пероксида. За испитивање
28 капацитета за адхеренцу, ове ћелије су након припреме која је детаљно описана додате
29 у бунарчиће микротитарске плоче ($1,25 \times 10^5$ ћелија/бунарчић) и инкубирани 10, 30 и 60
30 минута. Број адхерираних ћелија је процењиван након фиксације метанолом и бојења
31 метиленскоплавим, солубилизације преципитиране боје и мерења апсорбанције на 620
32 nm (GDV, Microplate Reader DV 990 BV 4/6). Капацитет за продукцију водоник пероксида
33 перитонеалних макрофага је испитиван колориметријским тестом. Након nanoшења
34 ћелија у бунарчиће микротитарске плоче ($2,5 \times 10^5$ ћелија/бунарчић) и инкубације током
35 2 сата у циљу адхезије, ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом (енглески:
36 *phorbol-12-myristate-13-acetate*; PMA), додавањем 100 μ L 25 nM PMA у раствору фенол
37 црвеног. Апсорбанција формираног обојеног једињења на 620 nm је измерена на читачу
38 микротитарских плоча (GDV, Microplate Reader DV 990 BV 4/6). Одређивање титра IgG
39 и IgM спроведено је на узорцима плазме пацова, применом комерцијалних
40 имуноензимских (енглески: *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA) тестова, и то Rat
41 Anti-SRBC IgM ELISA Kit (Life Diagnostics, Inc. PA, USA); каталoшки број 4200-2) и Rat
42 Anti-SRBC IgG ELISA Kit (Life Diagnostics, Inc. PA, USA; каталoшки број 4210-2). У овом
43 поглављу је описан начин припреме узорака слезине за проточну цитометрију и
44 приказана формула примењена за израчунавање укупне целуларности (броја
45 леукоцита) слезине. Одређивање процента и апсолутног броја Б и Т лимфоцита и NK
46 ћелија слезине је спроведено применом методе проточне цитометрије (цитометар
47 CyFlow SL (Partec, Münster, Немачка). За обележавање ћелија су коришћена
48 моноклонска антитела реактивна са површинским молекулима Т и В лимфоцита и NK
49 ћелија (редом: CD3, CD45RA и NKRP1A). Коришћена моноклонска антитела су
50 приказана табеларно: Rat CD3 (коњугат FITC; Invitrogen, каталoшки број MR5301); Rat
51 CD45RA (коњугат PE; Invitrogen, каталoшки број MR6404) и Rat NKRP1A (коњугат PE;
52 Invitrogen, каталoшки број MR6804). У оквиру популације Т лимфоцита (CD3+) су на
53 основу позитивне/негативне експресије површинског маркера CD45RA диференциране
54 две субпопулације: девичански и ефекторски (CD45RA+) и меморијски Т лимфоцити
55 (CD45RA-). Ниво неспецифичног везивања је одређен инкубацијом са контролним
56 антителима одговарајућег изотипа, што је такође приказано у одговарајућој табели.
57 Флуоресценца FITC је детектована на 480 nm, а флуоресценца PE на 580 nm. Апсолутни
58 број ћелија сваке појединачне популације је израчунат на основу укупне целуларности и
59 података о релативној заступљености појединачних популација у слезинама добијених
60 методом проточне цитометрије.

1 Резултати испитивања обрађени су стандардним статистичким методама коришћењем
2 Microsoft Office Excel програмског пакета. Израчунате су средња вредност, стандардна
3 девијација, стандардна грешка, медијана, коефицијент варијације, минимална и
4 максимална вредност у свакој анализираној групи. Резултати су груписани у
5 статистичке серије и приказани у виду табела и хистограма. За оцену статистичке
6 значајности разлика средњих вредности/медијана анализираних група примењен је
7 Студентов Т-тест односно Mann-Whitney U-тест, где је вредност вероватноће (p) мања
8 од 0,05 означена као статистички значајна. За утврђивање корелационе зависности
9 параметара коришћена је корелациона анализа, а процена значајности коефицијента
10 корелације је вршена на основу Pearson-ове таблице.

11 У поглављу „Резултати испитивања“ кандидат је текстуално, табеларно и графички
12 приказао резултате испитивања задатих параметара значајних за утврђивање утицаја
13 блокатора дејодиназа и статуса селена на урођени и стечени имунски одговор
14 јувенилних пацова.

15 У првом потпоглављу кандидат табеларно приказује резултате испитивања утицаја
16 блокатора дејодиназа и селендефицитне исхране на телесну масу пацова, параметре
17 статуса селена (концентрација селена у крви, активност GPx1 и активност GPx3) и
18 параметре тиреоидног статуса (T3, T4, TSH, T3/T4), након три и седам недеља огледа.
19 Резултати за сваку огледну групу су приказани као средња вредност \pm стандардна
20 девијација ($\bar{x} \pm SD$), уз обележавање статистички значајних разлика ($p < 0,05$) између
21 група које су упоређиване у огледу.

22 У другом потпоглављу, описани су резултати добијени при испитивању *in vitro*
23 стимулисане продукције пероксида код макрофага селенадекуватних и
24 селендефицитних пацова, нетретираних или третираних блокаторима дејодиназа,
25 појединачно и у комбинацији. Просечна продукција пероксида забележена у контролној,
26 селенадекуватној групи (Se+PTU-IA-) износила је $4,00 \pm 2,18 \mu M / 2,5 \times 10^5$ ћелија. Највиша
27 продукција пероксида је забележена у Se+PTU+IA- групи ($5,54 \pm 4,23 \mu M / 2,5 \times 10^5$ ћелија),
28 а најнижа у селендефицитној групи третираној са оба инхибитора (Se-PTU+IA+) и
29 износила је $0,80 \pm 0,82 \mu M / 2,5 \times 10^5$ ћелија. Дефицит селена је значајно модулисао
30 продукцију пероксида. У свим селендефицитним групама продукција H_2O_2 је била
31 статистички значајно мања ($p < 0,05$) у односу на контролну селенадекуватну групу
32 (инхибиција од 69%, 73%, 55% и 87%, редом за групе Se-PTU-IA-, Se-PTU-IA+, Se-
33 PTU+IA-, Se-PTU+IA+).

34 У трећем потпоглављу су приказани резултати испитивања утицаја примењених
35 третмана на капацитет перитонеалних макрофага пацова за спонтану адхеренцу *in*
36 *vitro*, након 10, 30 и 60 минута инкубације. Анализирана је и зависност нивоа адхеренце
37 од времена инкубације по огледним групама. Након 10 минута инкубације вредност
38 OD620 у контролној групи (Se+PTU-IA-) је била $0,043 \pm 0,004$. Ниво спонтане адхеренце
39 макрофага контролне групе није био промењен ни након 30, ни након 60 мин инкубације
40 (OD620 после 10 минута је била $0,047 \pm 0,006$, а после 60 минута $0,047 \pm 0,005$). Ниво
41 адхеренце макрофага осталих селенадекуватних група се није значајно разликовао од
42 контролне групе ни у једном термину испитивања. Након 10 минута инкубације
43 селендефицитна група без третмана инхибиторима (Se-PTU-IA-) као и група третирана
44 са оба инхибитора (Se-PTU+IA+) су имале благо, али статистички значајно већи ниво
45 адхеренце ($p < 0,05$), тј. вредности OD620 у односу на контролну селенадекуватну групу
46 (Se+PTU-IA-). У истом термину је у односу на селендефицитну групу нетретирану
47 инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-) значајно снижену вредност OD620 (за 17%,
48 $p = 0,001$) имала само група третирана јопаноичном киселином (Se-PTU-IA+), што је
49 забележено и након 30 минута ($p = 0,03$). Након 60 минута инкубације, у
50 селендефицитним групама је скоро двоструко већу вредност OD620 ($p = 0,001$) у односу
51 на контролну селенадекуватну групу (Se+PTU-IA-) имала група нетретирана
52 инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-), а значајно већа адхеренца ($p = 0,02$) у односу на
53 контролу је забележена и у групи третираној са оба инхибитора (Se-PTU+IA+). Нижу
54 вредност у односу на контролу ($p = 0,02$) је имала група третирана јопаноичном
55 киселином (Se-PTU-IA+). Све селендефицитне групе третиране инхибиторима
56 дејодиназа су након 60 минута инкубације имале значајно ниже вредности OD620 од
57 Se-PTU-IA- групе ($p < 0,01$). Кандидат наводи да је анализом зависности адхеренце од
58 времена инкубације установљено да макрофаги пацова селенадекуватне контролне

1 групе и селенадекватне групе третиране са оба инхибитора (Se+PTU+IA+) нису
2 значајно мењали ниво адхеренце у посматраном времену. За разлику од њих, адхезија
3 перитонеалних макрофага селенадекватних пацова третираних само јопаноичном
4 киселином и само пропилтиоурацилом је постепено расла. Код селендефицитних група
5 пацова значајан пораст адхезије током времена је детектован у групи која није
6 третирана инхибиторима (Se-PTU-IA-) и групи која је третирана са оба инхибитора (Se-
7 PTU+IA+), за разлику од група третираних појединачним инхибиторима дејодиназа.

8 Кандидат у четвртном поглављу приказује резултате утицаја испитиваних третмана на
9 целуларност слезине и релативни и апсолутни број основних ћелијских популација: Б и
10 Т лимфоцита и NK ћелија. Ово поглавље је стога подељено на 5 потпоглавља.

11 У првом потпоглављу четвртог поглавља, обрађени су резултати испитивања утицаја
12 примењених третмана на целуларност (укупан број леукоцита) слезине. Просечна
13 целуларност слезине контролне селенадекватне групе пацова нетретиране
14 инхибиторима дејодиназа (Se+PTU-IA-) износила је $566 \pm 227 \times 10^6$ леукоцита. Највећи
15 просечан број укупних леукоцита од $606 \pm 198 \times 10^6$ забележен је у селендефицитној групи
16 третираној јопаноичном киселином (Se-PTU-IA+), а најнижи од $151 \pm 77 \times 10^6$ у
17 селендефицитној групи третираној пропилтиоурацилом (Se-PTU+IA-). Статистички
18 значајно смањена целуларност је забележена у селенадекватним и селендефицитним
19 групама третираним пропилтиоурацилом самостално или у комбинацији са јопаноичном
20 киселином. Смањење целуларности у односу на контролну групу је било израженије
21 када су пацови истовремено били изложени и дефициту селена, па је уочено смањење
22 од 48% ($p=0,01$) у Se+PTU+IA- и 44% ($p=0,02$) у Se+PTU+IA+ групи, односно од 73%
23 ($p=0,001$) у Se-PTU+IA- и 62% ($p=0,003$) у Se-PTU+IA+ групи. Наведене селендефицитне
24 групе су се значајно разликовале и од селендефицитне групе нетретиране
25 инхибиторима дејодиназа (Se-PTU-IA-), са редукцијом целуларности од 65% ($p=0,002$) у
26 Se-PTU+IA- и 50% ($p=0,01$) у Se-PTU+IA+ групи, али и од свог селенадекватног пара са
27 смањењем од 49% ($p=0,001$) у Se-PTU+IA- групи и 32% ($p=0,04$) Se-PTU+IA+ групи. У
28 истом потпоглављу је показано да је промена целуларности слезине је била у високој
29 корелацији са променом телесне масе животиња ($r=0,71$; $p < 0,001$).

30 У другом потпоглављу четвртог поглавља приказани су резултати утицаја примењених
31 третмана на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и
32 апсолутни број Б лимфоцита у слезинама пацова. Процентуална заступљеност
33 популације Б лимфоцита у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) износила је
34 $10,1 \pm 5,2\%$ и разликовала се од свих осталих група у огледу. Статистички значајно
35 смањење ($p < 0,02$) процентуалне заступљености Б лимфоцита у односу на контролну
36 групу, са вредностима у опсегу од $1,6 \pm 0,8\%$ (Se+PTU+IA+ група) до $3,8 \pm 1,5\%$ (Se-PTU-
37 IA- група) забележено је у свим огледним групама, осим у селендефицитној групи у којој
38 су пацовима апликована оба инхибитора дејодиназа (Se-PTU+IA+). У овој групи је
39 забележена највећа процентуална заступљеност Б лимфоцита ($17,2 \pm 7,2\%$), значајно
40 већа него у контролној ($p < 0,05$) и свим осталим огледним групама. Највећи просечан
41 број Б лимфоцита је забележен у контролној селенадекватној групи, са вредношћу од
42 $50 \pm 33 \times 10^6$, а најнижи у Se+PTU+IA+ и Se-PTU+IA- групи, са $5 \pm 3 \times 10^6$ Б лимфоцита. У
43 свим осталим селенадекватним групама број Б ћелија је био статистички значајно мањи
44 него у контролној групи (~ 5, 8 и 10 пута мањи у Se+PTU-IA+, Se+PTU+IA- и Se+PTU+IA+
45 групи, респективно). У свим селендефицитним групама просечан број Б лимфоцита је
46 такође био мањи ($p < 0,05$) него у селенадекватној контролној групи (редом за 66%; 58%;
47 90% и 24% у Se-PTU-IA-, Se-PTU-IA+, Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+ групи). Ова разлика
48 није била статистички значајна у селендефицитној групи којој су апликована оба
49 инхибитора (Se-PTU+IA+).

50 Треће потпоглавље четвртог поглавља обрађује резултате испитивања утицаја
51 дефицита селена и инхибитора дејодиназа у селенадекватним и селендефицитним
52 условима на релативни садржај (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и
53 апсолутни број укупних Т лимфоцита у слезинама пацова. Процентуална заступљеност
54 укупних Т лимфоцита у контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) износила је
55 $55,0 \pm 10,0\%$. Најнижа процентуална заступљеност Т лимфоцита ($47,8 \pm 19,6\%$) је
56 утврђена у слезинама пацова Se+PTU+IA+ групе, а највиша ($79,3 \pm 6,4\%$) код пацова
57 Se+PTU-IA+ групе. Статистички значајно већа заступљеност Т ћелија у слезини у
58 односу на контролну групу је забележена у селенадекватној и селендефицитној групи

1 које су третиране пропилтиоурацилом ($p < 0,01$), са просечним релативним садржајем
2 ове популације од $73,3 \pm 3,2\%$ (Se+PTU+IA-) односно $73,3 \pm 12,8\%$ (Se-PTU+IA-), као и у
3 селенадекватној групи третираној јопаноичном киселином (Se+PTU-IA+) са $79,3 \pm 6,4\%$
4 ($p < 0,05$). Није забележена значајност разлика у процентуалној заступљености Т
5 лимфоцита у оквиру селендефицитних група. Број Т лимфоцита у контролној (Se+PTU-
6 IA-) групи износио је $296 \pm 150 \times 10^6$. Најмањи број је забележен у Se-PTU+IA+ групи
7 ($107 \pm 27 \times 10^6$), а највећи у Se-PTU-IA+ групи ($381 \pm 123 \times 10^6$). Између селенадекватних
8 група нису забележене значајне разлике у броју укупних Т лимфоцита, иако је смањење
9 броја ћелија ове популације у односу на контролу износило $23,4\%$ у Se+PTU+IA- групи и
10 $45,3\%$ у Se+PTU+IA+ групи. Међутим, селендефицитне групе са овим третманом
11 инхибиторима дејодиназа значајно су се разликовале од контролне селенадекватне
12 групе, са бројем Т лимфоцита мањим за 55% у Se-PTU+IA- ($p = 0,03$), односно 64% у Se-
13 PTU+IA+ групи ($p = 0,01$) у односу на контролу.

14 Четврто потпоглавље четвртог поглавља обрађује резултате испитивања утицаја
15 примењених третмана на релативни садржај (%) CD3+CD45RA+ (девичански и
16 ефекторски) и CD3+CD45RA- (меморијски) субпопулације Т лимфоцита, у односу на
17 укупну популацију Т лимфоцита слезине. У свим огледним групама је CD45RA-
18 субпопулација Т лимфоцита била доминантна у односу на субпопулацију CD45RA+
19 ћелија. Разлика у односу на контролну селенадекватну групу ($p = 0,04$) и
20 селендефицитну групу нетретирану инхибиторима дејодиназа ($p = 0,04$) је забележена у
21 селендефицитној групи која је третирана истовремено са оба инхибитора дејодиназа
22 (Se-PTU+IA+), у којој је релативна заступљеност популације наивних и ефекторских Т
23 ћелија (CD45RA+) била смањена, односно повећана заступљеност популације
24 меморијских (CD45RA-) Т лимфоцита.

25 Резултати приказани су у петом потпоглављу четвртог поглавља се односе на
26 испитивање утицаја дефицита селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај
27 (% у односу на укупан број леукоцита слезине) и апсолутни број NK ћелија у слезинама
28 пацова. Процент NK ћелија је био релативно уједначен између огледних група. У
29 контролној селенадекватној групи (Se+PTU-IA-) проценат NK ћелија био је $16,2 \pm 2,1\%$.
30 Значајно мања заступљеност ове популације је забележена у Se+PTU+IA+ групи
31 ($9,1 \pm 4,2\%$; $p = 0,003$) и Se-PTU-IA- групи ($11,1 \pm 3,5\%$; $p = 0,006$). Број NK ћелија се креато
32 од $29 \pm 21 \times 10^6$ у Se-PTU+IA- до $88 \pm 39 \times 10^6$ у контролној селенадекватној групи. Значајно
33 мањи број NK ћелија у односу на контролну групу је забележен у Se+PTU+IA+ групи са
34 смањењем за 70% ($p = 0,01$) и селендефицитним групама третираним
35 пропилтиоурацилом, са смањењем за 67% (Se-PTU+IA-; $p = 0,01$) и $62,5\%$ (Se-PTU+IA+;
36 $p = 0,02$). Селендефицитне групе се нису међусобно значајно разликовале у броју NK
37 ћелија.

38 У седмом потпоглављу кандидат даје збирни приказ резултата утицаја дефицита
39 селена и инхибитора дејодиназа на релативни садржај (%) популација ћелија слезине и
40 показује да, независно од третмана, у ћелијама слезине доминирају Т лимфоцити.
41 Одступање од овог налаза је нађено само у групама пацова који су били третирано са
42 оба инхибитора, с тим што је ефекат био израженији код селенадекватне у односу на
43 селендефицитну групу. Б лимфоцити су били мање присутни у слезини свих група
44 третираних пацова, са изузетком селендефицитне групе која је третирана са оба
45 инхибитора. Релативни садржај NK ћелија се незнатно мењао код третираних у односу
46 на нетретиране групе, са изузетком селенадекватне групе која је третирана са оба
47 инхибитора и селендефицитне нетретиране групе, где је установљена мања
48 заступљеност ове популације ћелија. Изразито повећање процентуалне заступљености
49 групе ћелија коју не препознаје ниједно од коришћених моноклонских антитела
50 детектовано је код селенадекватне групе која је третирана са оба инхибитора
51 ($41,5 \pm 23,4\%$) у односу на $13,5 \pm 8,8\%$, колико је детектовано у контролној групи. Све
52 остале огледне групе се нису разликовале од контролне.

53 У оквиру петог потпоглавља, кандидат приказује резултате испитивања утицаја
54 дефицита селена и инхибитора дејодиназа на хуморални имунски одговор пацова. Ово
55 потпоглавље је подељено на два дела, при чему први обрађује испитивање титра
56 природних и имуних IgM, а друго испитивање титра IgG, реактивних са антигенима
57 овчијих еритроцита. Код свих огледних неимунизованих пацова је измерен релативно
58 висок титар природних IgM антитела. Титар природних IgM реактивних са SRBC у

1 контролној групи био је 221 ± 178 ELISA U/mL, а остале селенадекватне групе се нису
2 разликовале од контроле. Уочено је да су виши просечни титри забележени у
3 селендефицидној половини група. Просечни титар IgM је у свим селендефицичним
4 групама био виши него у селенадекватној контролној групи и то за 134%, 165%, 114% и
5 77% у Se-PTU-IA-, Se-PTU-IA+, Se-PTU+IA- и Se-PTU+IA+ групи, редом. И поред високих
6 коефицијената варијације, ова разлика је била статистички значајна за све групе
7 ($p < 0,05$) осим Se-PTU+IA+ групе, где је била близу границе значајности ($p = 0,06$). По
8 просечним вредностима титра имуних IgM, забележеним пет дана након примарне
9 имунизације, ниједна огледна група се није значајно разликовала од контроле у којој је
10 забележени титар износио 2152 ± 1009 ELISA U/mL. У огледним групама није
11 забележено присуство IgG реактивних са антигенима овчијих еритроцита пре
12 имунизације. Титар IgG антитела у плазми пацова, одређиван три дана након
13 секундарне имунизације није се значајно разликовао између огледних група, а у
14 контролној групи је забележена висина титра 3427 ± 3367 ELISA U/mL. Кандидат
15 наглашава да је утврђена висока индивидуална варијабилност у забележеном титру
16 природних антитела, као и у индивидуалном одговору пацова на имунизацију.

17

18

19 VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској 20 дисертацији):

21

22

На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

23

24

25

26

27

28

29

1. Код пацова којима је ускраћен селен у храни концентрација селена у крви и активност селеноензима глутатион пероксидаза (GPx) у еритроцитима и крвној плазми били су значајно нижи него у селенадекватним групама. У групама пацова третираним само пропилтиоурацилом (PTU), или комбинацијом PTU и јопаноичне киселине (IA), уочена је системска хипотиреоза: значајно нижа концентрација тријодтиронина (Т3) и виши ниво тиреостимулирајућег хормона (TSH) у поређењу са нетретираним животињама; за разлику од тога, третман пацова са IA није довео до системске хипотиреозе.

30

31

32

33

34

2. Дефицит селена код пацова довео је до смањене продукције водоник пероксида од стране макрофага. Просечна продукција водоник пероксида код селенадекватних група пацова третираних инхибиторима дејодиназа није се значајно разликовала у односу на контролу, док је код селендефицичних пацова била значајно мања у поређењу са контролном групом и са одговарајућим селенадекватним групама.

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

3. Ниво адхеренце перитонеалних макрофага селенадекватних пацова третираних инхибиторима дејодиназа се 10., 30. и 60. минута инкубације није разликовао од контролне групе. Код селендефицичних животиња, ниво адхеренце перитонеалних макрофага нетретираних група и групе третираних комбинацијом PTU и IA је био, у односу на контролну групу благо повишен 10. минута, непромењен 30. минута и изразито повишен 60. минута. Код селендефицичних пацова, само макрофаги групе третираних IA су имали 10. и 30. минута нижи ниво адхеренце у односу на нетретирану селендефицичну групу. Након 60 минута све селендефицичне групе третираних инхибиторима су имале значајно нижи ниво адхеренце у односу на нетретирану селендефицичну групу.

45

46

47

48

4. Ниво адхеренце перитонеалних макрофага селенадекватних пацова равномерно је и значајно растао током 60 минута у групама третираним PTU или IA, док је код селендефицичних група 60. минута уочен значајан пораст у нетретираној групи и групи третираној комбинацијом PTU и IA.

49

50

51

5. Укупан број леукоцита (целуларност) слезине био је значајно мањи у свим групама пацова код којих је постојала системска хипотиреоза. Константована је значајна корелација између телесних маса и целуларности слезине пацова.

52

53

54

55

56

57

6. Процентуална заступљеност Б лимфоцита у односу на укупан број леукоцита слезине, као и њихов апсолутан број, били су значајно нижи у свим групама селенадекватних и селендефицичних пацова у поређењу са контролном групом; изузетак је група селендефицичних пацова третираних комбинацијом PTU и IA у којој је процентуална заступљеност Б лимфоцита била значајно виша од контроле, док се апсолутан број није разликовао.

- 1 7. Процентуална заступљеност Т лимфоцита у односу на укупан број леукоцита
2 слезине, била је значајно већа у групама третираним само РТУ и у селенадекватној
3 групи третираној само IA. Апсолутни број Т лимфоцита слезине био је значајно мањи у
4 групама пацова третираних комбинацијом РТУ и IA, и селендефицичних пацова
5 третираних само РТУ..
- 6 8. У популацији укупних Т лимфоцита слезине на основу експресије CD45RA антигена
7 код свих група пацова детектоване су субпопулације CD45RA- меморијских Т
8 лимфоцита и CD45RA+ девичанских/ефекторних Т лимфоцита. У свим групама пацова
9 субпопулација CD45RA- Т лимфоцита је била доминантна. Удео субпопулација
10 CD45RA+ и CD45RA- Т лимфоцита је био непромењен у односу на контролну групу у
11 свим групама пацова са изузетком селендефицичне групе третиране комбинацијом РТУ
12 и IA код којих је удео меморијских CD45RA- Т лимфоцита је био значајно већи, а удео
13 девичанских/ефекторних CD45RA+ Т лимфоцита значајно нижи у односу на остале
14 групе.
- 15 9. Процентуални удео NK ћелија у популацији укупних леукоцита слезине био је
16 значајно мањи у поређењу са контролом у групи селенадекватних пацова третираних
17 комбинацијом РТУ и IA и селендефицичној нетретираној групи. Апсолутни број NK
18 ћелија слезине код селенадекватних животиња био је значајно нижи у односу на
19 контролу у групама третираним комбинацијом РТУ и IA и код селендефицичне групе
20 третиране само РТУ.
- 21 10. Титар природних IgM антитела реактивних са антигенима овчијих еритроцита није
22 се разликовао међу групама селенадекватних пацова, док је код селендефицичних
23 животиња измерен значајно већи титар IgM антитела у односу на контролу код
24 нетретираних и група третираних само РТУ и само IA.
- 25 11. Након имунизације пацова овчијим еритроцитима, титар IgM и IgG антитела
26 реактивних са антигенима овчијих еритроцита није се разликовао између
27 експерименталних група.

28
29

30 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
31 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и**
32 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених**
33 **резултата):**
34

35 Резултати истраживања које је спровео кандидат у потпуности су у сагласности са
36 постављеним циљем и задацима истраживања. Остварени резултати истраживања су
37 приказани текстуално, табеларно и графички, а текст резултата је написан јасним и
38 разумљивим стилем. Закључци су правилно формулисани и у складу са резултатима
39 истраживања.
40
41
42
43

44 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**
45

46 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави
47 теме?

48 Докторска дисертација Јелене Бјелице под називом „Утицај дефицита селена и
49 блокатора дејодиназа на урођени и стечени имунски одговор јувенилних пацова“
50 написана је у складу са образложењем наведеним у пријави.
51

52 2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску
53 дисертацију?

54 Докторска дисертација садржи све елементе који се захтевају за завршену докторску
55 дисертацију.
56

57 3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

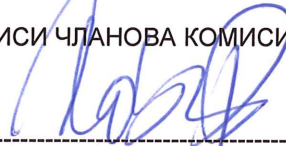
1 Оригиналан експериментални дизајн је омогућио да се у јединственом експерименту, на
2 широком плану, у хомогеној популацији животиња, релативно једноставним
3 статистичким методама прате и пореде укрштени утицаји дефицита селена и два типа
4 инхибиције дејодиназа на параметре урођеног и стеченог имунског одовора код
5 јувенилних пацова.

6
7 **IX ПРЕДЛОГ:**

8
9 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**
10 **три понуђених могућности):**
11 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

12
13 ДАТУМ
14 08.06.2017.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ



16
17 1. Др Иван Јовановић, редовни професор,
18 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду



19
20 2. Др Светлана Милановић, доцент,
21 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду



22
23 3. Др Весна Илић, научни саветник,
24 Институт за медицинска истраживања Универзитета у Београду

25
26
27
28
29