

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПРИМЉЕНО:			
Орг.јед.	Број	Прилог	Вредност
05	9060/2-2	2	...

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-689/40 од 05.07.2017. год, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Неде Милосављевић под називом:

“ Утицај мезенхималних матичних ћелија на сигнални пут IL-17 у моделима акутног хепатитиса и фиброзе јетре“

Чланови комисије су:

1. Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, председник;
2. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Имунологија*, члан;
3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области *Микробиологија и имунологија* и *Онкологија*, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Већу за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Неда Милосављевић је рођена 28.08.1986. године у Краљеву. Основну школу и Гимназију, друштвено-језички смер, завршила је као носилац дипломе „Вук Караџић“. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је 2005/2006. године, а дипломирала 2012. године, са просечном оценом 9,03. Након дипломирања обавила је лекарски стаж и положила стручни испит. Школске 2012/2013. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Усмени докторски испит је положила у јулу 2016. године. Од фебруара 2013. волонтирала у Центру за онкологију и радиологију КЦ Крагујевац. Од августа 2016. запослена у Центру за онкологију и радиологију КЦ Крагујевац. Специјализацију из Радијационе онкологије уписала у априлу 2017. године. Укључена је у научно-истраживачки рад у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

“ Утицај мезенхималних матичних ћелија на сигнални пут IL-17 у моделима акутног хепатитиса и фиброзе јетре“

Предмет:

Интерлеукин 17 (IL-17) игра значајну улогу у патогенези акутног хепатитиса и фиброзе јетре. Због својих имуномодулативних карактеристика, мезенхималне матичне ћелије (енг. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) редукују акутно и хронично оштећења јетре, међутим молекулски механизам којим супримирају инфламацију у овим болестима још увек није разјашњен. У циљу испитивања утицаја MSCs на сигнални пут IL-17 у патогенези акутног хепатитиса и фиброзе јетре, користиће се експериментални модели акутног хепатитиса изазвани α -галактоцерамидом и угљен тетра хлоридом, док ће се фиброза јетре изазивати угљен тетра хлоридом. Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја C57BL/6. За анализу степена оштећења јетре, користиће се биохемијски тестови за одређивање серумске концентрације ензима јетре, као и хистолошка анализа препарата

јетре. Експресија гена који су одговорни за фиброзу ће се одређивати *real-time* PCR-ом. Употребом коњугованих анти-мишијих антитела, интрацелуларним бојењем и проточном цитометријом одређиваће се фенотип имунских ћелија које инфилтришу јетру оболелих животиња, док ће хепатотоксичност NKT ћелија које продукују IL-17 бити одређива коришћењем *xCELLigence* система. ELISA тест и спектрофотометрија ће се користити за одређивање серумске концентрације цитокина и солубилних фактора које продукују MSCs.

На основу доступне литературе, очекује се да ће примена MSCs смањити серумску концентрацију IL-17 и продукцију IL-17 у интрахепатичним NKT ћелијама у акутном оштећењу јетре, односно да ће редуковати секрецију IL-17 у CD4+T лимфоцитима у фибрози јетре, као и да ће омогућити конверзију ових инфламацијских лимфоцита у регулаторне ћелије.

Хипотезе:

У акутном оштећењу јетре, примена MSCs смањује секрецију IL-17 из интрахепатичних NKT ћелија, док у фибрози јетре редукује ослобађање IL-17 из CD4+ T лимфоцита чиме значајно смањује оштећење хепатоцита.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, др мед. Неда Милосављевић је објавила рад у часопису категорије M21 који се објављује на једном од водећих светских језика, у коме је она први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

Neda Milosavljevic, Marina Gazdic, Bojana Simovic Markovic, Aleksandar Arsenijevic, Jasmin Nurkovic, Zana Dolicanin, Valentin Djonov, Miodrag L. Lukic, Vladislav Volarevic. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between IL-17 producing and regulatory NKT cells. Liver Transplantation. 2017; doi: 10.1002/lt.24784. **M21**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Интерлеукин 17 (енг. *interleukin-17*, IL-17) игра значајну улогу у патогенези акутног хепатитиса и фиброзе јетре. Познато је да је концентрација IL-17 значајно повећана у

серуму пацијената оболелих од алкохолне болести и цирозе јетре, што је праћено и повећаном заступљеношћу Т лимфоцита и неутрофила који продукују IL-17 у запаљенском инфилтрату јетре. Повећана експресија IL-17 у јетри и повећана концентрација IL-17 у серуму је у корелацији са тежином оштећења хепатоцита као и са бројем интрахепатичних CD4+ Т лимфоцита и NKT ћелија (енг. *natural killer T cells*, *NKT cells*) које продукују IL-17.

Прекомерна експресија IL-17 резултује масивном некрозом хепатоцита, док блокирање IL-17 сигнализације значајно ублажава оштећење јетре, указујући на то да блокада сигналног пута IL-17/ IL-17R може представљати нови приступ у терапији имунски посредованих обољења овог органа.

У фибрози јетре, која представља централни патолошки процес у хроничном оштећењу јетре, значајну профиброгену улогу игра IL-17. IL-17, ког продукују Th17 лимфоцити, стимулише стелатне ћелије јетре (енг. *hepatic stellate cells*, HSCs), да повећају синтезу колагена тип I, глаткомишићног α -актина (енг. *α -smooth muscle actin*, α SMA) и фактора трансформације раста β 1 (енг. *transforming growth factor (TGF)- β 1*), у циљу поспешивања фиброзе јетре.

Мезенхималне матичне ћелије (енг. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) су адултне матичне ћелије, које се могу наћи у готово свим органима, укључујући и јетру. MSCs супримирају имунски одговор, директним контактом са ћелијама имунског система или продукцијом солубилних фактора. Због својих имуномодулацијских карактеристика и потенцијала да диферентују у хепатоците, MSCs представљају потенцијално нов терапијски агенс у лечењу акутног оштећења и фиброзе јетре.

MSCs утичу на пролиферацију, активацију и ефекторске функције Т лимфоцита, професионалних антиген презентујућих ћелија (дендритских ћелија (енг. *dendritic cells*, DCs), макрофага, В лимфоцита), NK ћелија (енг. *natural killer cells*, *NK cells*) и NKT ћелија.

У акутном оштећењу јетре мишева, изазваном угљен тетра хлоридом (енг. *carbon tetrachloride*, CCl₄) односно α -галактоцерамидом (енг. *alphagalactoceramide*, α -GalCer), и фибрози јетре изазиваној CCl₄ главну ефекторску улогу имају Т лимфоцити, неутрофили и

NKT ћелије. Све ове ћелије продукују IL-17, због чега су ови експериментални модели погодни за испитивање молекулских и ћелијских механизма укључених у модулацију IL-17 сигнализације посредством MSCs, у патогенези акутног и хроничног оштећења јетре.

2.5. Значај и циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је да се испита, да ли примена MSCs утиче на модулацију сигналног пута IL-17, у патогенези акутног оштећења јетре, као и фиброзе јетре.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Утврдити да ли примена MSCs утиче на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре.
2. Утврдити молекулске механизме којим MSCs утичу на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашње студије су показале да MSCs модулирају пролиферацију, активацију и ефекторске функције професионалних антиген презентујућих и NK ћелија, Т и В лимфоцита, међутим њихова способност да модулирају функцију неутрофила и NKT ћелија, које су најзаступљеније у продукцији IL-17 у акутном оштећењу јетре још увек није позната.

Такође, иако је познато да MSCs смањују хроничну инфламацију јетре и да могу да супримирају пролиферацију Th1 лимфоцита, још увек није довољно позната њихова способност да модулирају функцију Th17 лимфоцита у фибрози јетре.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија

2.7.2. Ћелијска линија мишијих мезенхималних матичних ћелија

У експериментима ће се користити комерцијална линија мишијих мезенхималних матичних ћелија, које су изоловане из костне срже C57BL/6 мишева (*Gibco/Invitrogen*, кат. број S10502-01). Ћелије ће се узгајати у DMEM медијуму (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) који садржи l-глутамин (200 mM), неесенцијалне аминокиселине (10x), 1% *Penicillin/Streptomycin* (100x) и 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Ћелије ће се инкубирати на 37 °C у атмосфери 5% CO₂, а у складу са препорукама произвођача (*Gibco/Invitrogen*).

2.7.3. Кондициониран медијум мезенхималних матичних ћелија (MSC-CM)

Мезенхималне матичне ћелије ће бити засејане у густини од 10 000 ћелија/cm². У циљу добијања кондиционог медијума мезенхималних матичних ћелија (енг. *MSC-conditioned medium*, MSC-CM), првобитно ће се MSCs култивисати у комплетном медијуму који садржи серум и инкубираће се на 37°C у атмосфери са 5% CO₂. При конфлуентности од 80%, ћелије ће се два пута испрати са 1X PBS (*Phosphate Buffered Saline, Invitrogen*), након чега ће се култивисати у медијуму без серума. Након 48 сати, медијум ће се узети, центрифугирати на 13,000×g, на 4°C 10 минута и заледити на -80°C до употребе.

2.7.4. Фармаколошка инхибиција индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO)

Мезенхималне матичне ћелије ће се култивисати 48 сати у медијуму који садржи 1 mM 1-метилтриптофана (енг. *1-methyltryptophan*, 1-MT, *Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*), инхибитор ензимске активности индоламин 2,3 деоксигеназе (енг. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO).

2.7.5. Експерименталне животиње

In vivo експерименти ће се спровести у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експериментима. Користиће се мишеви соја C57BL/6, мушког пола, старости од 8 до 10 недеља, Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинске академије (ВМА). За овај експеримент је предвиђено укупно 360 животиња. Животиње ће бити распоређене у следеће експерименталне (Е) и контролне (К) групе:

- K1: 30 мишева који ће интраперитонеално примити кукурузно уље (енг. *corn oil*) (1 mg/kg телесне масе).
- K2: 30 мишева који ће интраперитонеално примити *corn oil* (1 mg/kg телесне масе) и интравенски примити 500 000 MSCs ресуспендованих у 200µL NaCl-а.
- E1: 30 мишева који ће интраперитонеално примити раствор CCl₄/*corn oil* у односу 1:1 (2 µl/g телесне масе).
- E2: 30 мишева који ће интраперитонеално примити раствор CCl₄/*corn oil* у односу 1:1 (2 µl/g телесне масе) и интравенски 500 000 MSCs ресуспендованих у 200µL NaCl-а.
- K3: 30 мишева који ће интравенски примити 200 µL NaCl-а.
- K4: 30 мишева који ће интравенски примити 500 000 MSCs ресуспендованих у 200 µL NaCl-а.
- E3: 30 мишева који ће интравенски примити α-GalCer (50 µg/kg телесне масе) раствореног у 200 µL NaCl-а.
- E4: 30 мишева који ће непосредно након примене α-GalCer (50 µg/kg телесне масе) раствореног у 200 µL NaCl-а интравенски примити 500 000 MSCs ресуспендованих у 200 µL NaCl-а.
- K5: 30 мишева који ће интраперитонеално примити *corn oil* (1 mg/kg телесне масе).
- K6: 30 мишева који ће интраперитонеално примити *corn oil* (1 mg/kg телесне масе) и интравенски примити 1 x 10⁶ MSCs ресуспендованих у 200 µL NaCl-а.
- E5: 30 мишева који ће интраперитонеално примити раствор CCl₄/*corn oil* у односу 1:3 (1 µL/g телесне масе).
- E6: 30 мишева који ће интраперитонеално примити раствор CCl₄/*corn oil*, однос 1:3 (1 µL/g телесне масе) и интравенски 1 x 10⁶ MSCs ресуспендованих у 200µL NaCl-а.

2.7.6. Индуковање акутног хепатитиса и апликација MSCs

Акутно оштећење јетре ће се изазвати интраперитонеалном апликацијом раствора $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у односу 1:1 и дози $2 \mu\text{L/g}$ телесне масе, или интравенском апликацијом $\alpha\text{-GalCer}$ (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у дози $50 \mu\text{g/kg}$ телесне масе, који ће се растворити у $200 \mu\text{L NaCl}$ -а.

Непосредно након апликације $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ односно $\alpha\text{-GalCer}$ -а, мишевима ће се интравенски апликовати $500\,000$ MSCs ресуспендованих у $200 \text{ ml } 0.9\% \text{ NaCl}$, у једној дози, путем репне вене.

2.7.7. Индуковање фиброзе јетре и апликација MSCs

Фиброза јетре ће се изазивати интраперитоналном апликацијом раствора $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у односу 1:3 и дози $1 \mu\text{L/g}$, телесне масе, два пута недељно у трајању од месец дана. Интравенски, у репну вену, ће се апликовати 1×10^6 MSCs, 24 сата након прве примене $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$, а затим 7., 14., и 21. дана експеримента.

2.7.8. Мерење трансминаза у серуму

Након жртвовања експерименталних животиња, крв ће се извадити из абдоминалне аорте. У серуму ће се мерити вредности аспартат и аланин трансминазе (енг. *aspartate transaminase*, AST и *alanine transaminase*, ALT) применом *Olympus* китова и коришћењем *AU 400 Olympus chemistry analyzer*-а.

2.7.9. Патохистолошка анализа ткива јетре

Мишеви ће се жртвовати цервикалном дислокацијом након чега ће им се изоловати јетра за патохистолошку анализу. Исечци ткива у парафинским калупима користиће се за хистолошки преглед бојењем хематоксилин – еозином и специфичним бојењем *PicroSirius-Red*. На хистолошким препаратима ће се одређивати степен некрозе и фиброзе хепатоцита.

2.7.10. Мерење концентрације цитокина и имуносупресивних фактора у серуму

У серуму мишева ће се мерити концентрација цитокина (IL-17, TNF- α , и IL-10) и имуносупресивних фактора које продукују MSCs (индоламин 2, 3 деоксигеназе (енг. *indoleamine 2 3-dioxygenase*, IDO), простагландина E2 (енг. *prostaglandin E2*, PGE2) и фактора раста хепатоцита (енг. *hepatocyte growth factor*, HGF)) ELISA методом (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) према утврђеном протоколу произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.7.11. Одређивање кинуренина у серуму

Обзиром да IDO катализује метаболизам триптофана чији је крајњи продукт кинуренин, активност IDO ће се одредити спектрофотометријском анализом кинуренина у серуму мишева, код којих је фиброза јетре изазивана CCl₄.

2.7.12. Одређивање профиброгених протеина

Real-time RT-PCR техником ће се испитати да ли примена MSCs утиче на експресију профиброгених фактора колагена тип I, глаткомишићног α -актина (енг. *α -smooth muscle actin*, α SMA) и фактора трансформације раста β 1 (енг. *transforming growth factor* (TGF)- β 1), у оштећењу јетре изазиваном CCl₄/*corn oil*. Изолација укупне рибонуклеопротеинске киселине (енг. *Ribonucleic acid*, RNA) из ткива јетре миша ће се урадити употребом тризол реагенса (енг. *TRIzol reagent*, Invitrogen, Carlsbad, CA). Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA (енг. *Complementary Deoxyribonucleic acid*, cDNA) ће се урадити коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), према упутству произвођача, након чега ће се мерити експресија профиброгених протеина, методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енг. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енг. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR). Реакција qRT-PCR ће се урадити у *Mastercycler[®] ep realplex* апарату (Eppendorf, Hamburg, Germany).

2.7.13. Изолација моноклеарних ћелија из јетре и анализа фенотипа ћелија изолованих из јетре

За изолацију моноклеарних ћелија из јетре, користиће се метод механичке разградње јетре. Након издвајања јетре, уклониће се жучна кеса и урадити перфузија јетре помоћу 7 mL PBS-а кроз *v. porta-e*. Маказицама ће се уситнити јетра на делове и нежно здробити кроз 200 μ m челичну мрежу, коришћењем „клипа“ шприца а потом и кроз ћелијско сито. Садржај који се добије ће се ресуспендовати у 50 ml RPMI-1640 медијума, који садржи *GlutaMax* 1,25 mM, HEPES и 10% FCS, и центрифугирати на 507 r.p.m. (60 g) 1 минут на собној температури, без наглог заустављања центрифуге (енг. *off break setting*). У следећем кораку, добијени супернатант (45 ml), у коме се налазе интрахепатичне ћелије ће се пребацити у нове епрувете и центрифугирати (1433 r.p.m. (480 g) 8 минута на собној температури, са активираним опцијом наглог кочења (енг. *high break setting*)). Тако добијени талог ће се ресуспендовати у 10 ml 37.5% *Percoll* у HBSS медијуму који садржи 100 U/ ml хепарина и онда центрифугирати на 1907 r.p.m. (850 g) 30 минута на собној температури, без наглог заустављања центрифуге. Овако добијени талог ће се ресуспендовати у 5 ml пуфера за лизирање еритроцита и инкубираће се у трајању од 5 минута, на леду (на +4°C). Након истека инкубације, додаће се 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом, чиме ће се зауставити даље лизирање. Након тога ћелије ће се центрифугирати на 1433 r.p.m. (480 g) 8 минута на 8°C, са активираним опцијом наглог кочења. Коначно, добијени талог ће се ресуспендовати или у 1 ml PBS који садржи 1% FCS односно 0,1% NaN₃ (тзв. пуфер за анализу проточном цитометријом) или у 1 ml комплетног RPMI-1640 медијума (који садржи *GlutaMax* 1,25 mM, HEPES и 10% FCS).

Након жртвовања експерименталних животиња, спровешће се анализа изолованих моноклеарних ћелија јетре. Инкубираће се 1×10^6 моноклеарних ћелија са R-PE обележеним анти-мишијим CD3, CD4, CD49b, CD8, CD25, CD45, Ly6G и CD11b моноклонским антителима, обележеним различитим флуоресцентним бојама (*allophycocyanin*, APC; *fluorescein*, FITC; *phycoerythrin*, PE; *peridinin chlorophyl protein complex*, PerCP) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) пратећи препоруке произвођача. Моноклеарне ћелије ће се даље бојити на присуство интрацелуларног IL-17 и IL-10. За интрацелуларно бојење, ћелије ће се стимулирати са 5 μ g/ml PMA (*phorbol 12-myristate*

13-acetate-a) и 5 µg/ml јономицина и 0.8µl *GolgiStop* (BD Biosciences), 5 часова на 37°C. Након инкубације, ћелије ће се фиксирати и пермеабилитовати употребом BD *Cytofix/Cytoperm kit*-а (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележити одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима. Интрацелуларно бојење на Foxp3 ће се спровести употребом BD *Bioscience buffer* кита, крема упутству произвођача. Анализа проточне цитометрије ће се спровести на BD Biosciences FACSCalibur уређају и анализирана на одговарајућем програму (*Flowing software analysis program*).

2.7.14. Изолација NKT ћелија и CD4+ Т лимфоцита из јетре

NKT ћелије и CD4+ Т лимфоцити ће се издвојити из мононуклеарних ћелија јетре магнетном сепарацијом (*Miltenyi Biotec*) према утврђеном протоколу произвођача.

2.7.15. Испитивање паракриних ефеката MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија *in vitro*

За испитивање паракриног ефекта MSCs на NKT ћелије у акутном хепатитису, NKT ћелије које ће се изоловати из јетре мишева, стимулисаће се α-GalCer-ом (100 ng/ml) и кокултивисати са MSCs у *transwell* систему (0,4 µm, *Corning Incorporated, Life Sciences, France*). NKT ћелије ће се засејати у доњој, а MSCs у горњој комори, у односу 10:1. Након 48 сати инкубације, ELISA есејом ће се анализирати присуство цитокина (TNF-α, IFN-γ, IL-4 и IL-10) у супернатанту, проточном цитометријом ће се анализирати продукција цитокина (TNF-α, IFN-γ, IL-4 и IL-10) у NKT ћелијама, а коришћењем *xCELLigence system*-а цитотоксичност NKT ћелија.

2.7.16. Мерење цитотоксичности NKT ћелија употребом *xCELLigence* система

НерG2 ћелије (4 x 10⁴ НерG2 ћелија/*well*) ће се користити као циљане (*target*) ћелије за NKT ћелије које ће се изоловати из јетре експерименталних животиња. Користиће се однос 10:1, ефекторских према циљаним ћелијама (*E:T ratio*). НерG2 ће се ресуспендовати у комплетном медијуму (4×10⁵ ћелија/ml комплетног медијума) тако да у свакој комори Е16 плоче буде по 4×10⁴ ћелија у волумену од 100 µl. NKT ћелије ће се ресуспендовати у комплетном медијуму (4×10⁶ ћелија/mL комплетног медијума), а затим ће се у

одговарајуће коморе додати у волумену од 100 μ l. Након додавања ефекторских ћелија, E16 плоче ће се поставити у *xCELLigence system* којим ће се мерити ћелијски индекс на 6 часова (37°C; 5% CO₂). За обраду података користиће се *RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences)*.

2.7.17. Испитивање паракриних ефеката MSCs на функцију CD4⁺ Т лимфоцита *in vitro*

За испитивање паракриног ефекта MSCs на CD4⁺ Т лимфоците у фибрози јетре, CD4⁺ Т лимфоцити који ће се изоловати из јетре мишева, стимулисаће се Конканавалином А (енг. *Concanavalin A*) (2.5 μ g/mL) и IL-2 (енг. *Interleukin-2*, 50 ng/mL) и кокултивисати са MSCs у *transwell* систему (0,4 μ m, *Corning Incorporated, Life Sciences, France*). CD4⁺ Т лимфоцити ће се засејати у доњој, а MSCs у горњој комори, у односу 10:1. ELISA есејом (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) ће се одређивати концентрација цитокина у супернатанту.

Снага студије

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима за серумске концентрације цитокина (IL-17, TNF- α , и IL-10), односно процента мононуклеарних ћелија које продукују ове цитокине, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student's T* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму *G*Power3*. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 30 за сваку од група.

Статистичка обрада података

За статистичку обраду свих података користиће се SPSS пакет, верзија 20.0. Подаци ће бити приказани као Mean \pm SE. Статистичка значајност ће се одредити користећи *Student T* тест, и када је потребно *Mann-Whitney U* тест. Статистички значајна разлика у добијеним

вредностима између група износиће $p < 0.05$, док ће статистички веома значајна разлика бити $p < 0.01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

На основу доступне литературе, очекује се да ће примена MSCs смањити серумску концентрацију IL-17 и продукцију IL-17 у имунским ћелијама, као и да ће повећати заступљеност регулаторних ћелија у јетри. Ово истраживање би требало да опише молекуларне механизме одговорне за модулацију сигналног пута IL-17 у јетри што може бити од значаја за дизајн нових терапијских праваца у лечењу фулминантног хепатитиса и фиброзе јетре.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Користећи акутно оштећење јетре, индуковано изазваном угљен тетра хлоридом (енг. *carbon tetrachloride*, CCl_4) односно α -галактоцерамидом (енг. *alphagalactoceramide*, α -GalCer), и фиброзу јетре изазвану CCl_4 одређивањем трансаминаза, хистолошком анализом препарата јетре, проточном цитометријом, ELISA-ом, тестом цитотоксичности и PCR-ом биће испитан утицај MSCs на ћелије имунског система које продукују IL-17 *in vivo* и *in vitro*. Расветљавање механизма којим MSCs на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре може представљати нови приступ у терапији ових обољења код људи.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Владислав Воларевић, који је ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови проф. др Владислава Воларевића, који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Volarevic V**, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol.* 2012; 56(1):26-33.
2. **Volarevic V**, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2012; 55(6):1954-64.
3. **Volarevic V**, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol.* 2015; 89(3):437-50.
4. **Volarevic V**, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol.* 2015; 45(2):531-43.
5. **Volarevic V**, Paunovic V, Markovic Z, Simovic Markovic B, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D, Lukic ML, Trajkovic V. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage. *ACS Nano.* 2014; 8(12):12098-109.
6. Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML, **Volarevic V**. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; doi: 10.1002/term.2452.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Миодраг Л. Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, председник;
2. **Проф. др Владимир Трајковић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Имунологија*, члан;

3. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области *Микробиологија и имунологија* и *Онкологија*, члан;

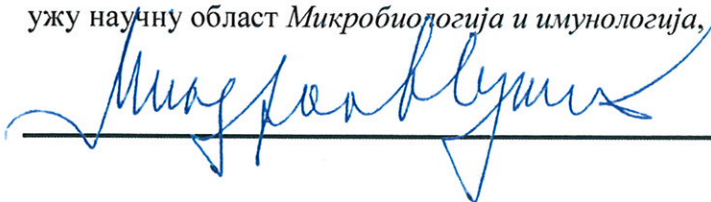
Закључак и предлог комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, др мед. Неда Милосављевић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

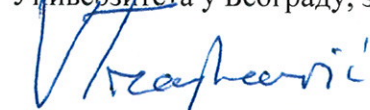
Комисија предлаже Већу за медицинске науке у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Неде Милосављевић, под називом “**Утицај мезенхималних матичних ћелија на сигнални пут IL-17 у моделима акутног хепатитиса и фиброзе јетре**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

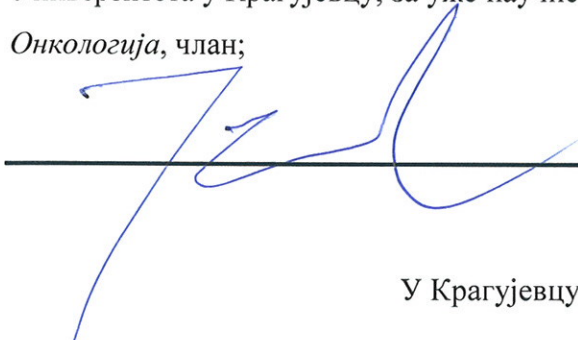
1. Проф. др Миодраг Ј. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, председник;



2. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Имунологија*, члан;



3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области *Микробиологија и имунологија* и *Онкологија*, члан;



У Крагујевцу, 13.07.2017. године