

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО- НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-395/34 од 10.06.2022.године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата др Драгице Павловић и предложеног ментора за израду докторске дисертације под називом:

**„Утицај дуванског дима на хепатопротективна својства мезенхимских матичних
ћелија“**

Чланови комисије су:

1. Доц. др **Марина Газдић Јанковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник;
2. Доц. др **Александар Арсенијевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Онкологија, члан;
3. Проф. др **Срђан Пешић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан;
4. НС **Данијела Пецарски**, научни сарадник Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, члан;
5. Доц. др **Јована Брадић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно- научном већу Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидаткиња Драгица Павловић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Мезенхимске матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal stem cells*, MSCs) редукују акутно оштећење јетре. Показано је да су хепатопротективни ефекти MSCs првенствено засновани на њиховим имуномодулаторним својствима. Након оштећења јетре MSCs одлазе на места повреде, супримирају активност интрахепатичних NKT ћелија које продукују TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-17, а повећају концентрацију IL-10 у серуму, што за последицу има смањење оштећења јетре. MSCs смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре на индоламин-2,3-диоксигеназа (енгл. *indolamine 2,3-dyoxigenase*, IDO) завистан начин. Наиме, секрецијом IDO-а, MSCs подстичу експанзију регулаторних Т лимфоцита и повећавају њихов капацитет за производњу IL-10, што резултира супресијом хепатотоксичности NKT ћелија. Излагањем MSCs дуванском диму се мења њихов капацитет за миграцију и диференцијацију. Осим тога, вијабилност и пролиферативни капацитет MSCs изложених дуванском диму су смањени, на дозно и временски зависни начин. Такође, дувански дим повећава експресију про-инфламацијских гена и индукује стварање про-инфламацијског фенотипа MSCs. Дугорочно излагање дуванском диму изазива и повећану синтезу реактивних врста кисеоника (енгл. *reactive oxygen species*, ROS) и смањену активност антиоксидативних ензима у MSCs. Све наведено за последицу има да MSCs изложене дуванском диму имају смањен капацитет за супресију пролиферације CD4+Т и CD8+Т лимфоцита. Ипак, утицај дуванског дима на хепатопротективна својства MSCs и на њихов капацитет да супримирају функције инфламацијских NKT ћелија и Т лимфоцита, главних ефекторских ћелија у акутном оштећењу јетре, није познат.

2.2.Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Регенеративни и имуномодулаторни потенцијал MSCs је показан у различитим моделима оштећења јетре. Досадашње студије су углавном испитивале утицај дуванског дима на пролиферацију, миграцију, диференцијацију и вијабилност MSCs. Међутим, не постоје подаци о утицају и међусобној повезаности дуванског дима и хепатопротективних својстава MSCs. На основу досадашњих сазнања из литературе, очекује се да ће дувански дим смањити капацитет MSCs да супримирају цитотоксичност и продукцију инфламацијских цитокина у Т лимфоцита и NKT ћелијама у јетри. Ово истраживање би дало нова сазнања о утицају дуванског дима на имуномодулаторна својства MSCs, и то пре свега о утицају дуванског дима на капацитет MSCs да редукују оштећење хепатоцита, супримирањем главних ефекторских ћелија у акутном хепатитису. Сходно томе, крајњи исход овог рада пружио би значајан допринос побољшању тренутних терапијских могућности, што би имало значаја за успостављање нових терапијских приступа код пушача и пацијената са инфламацијским болестима јетре.

2.3.Наслов, циљеви и хипотезе докторске дисертације

Наслов: Утицај дуванског дима на хепатопротективна својства мезенхимских матичних ћелија

Циљеви: Испитивање утицаја дуванског дима на хепатопротективна својства MSCs.

Хипотезе:

- 1) H₀ хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму не мења капацитет MSCs да продукују инфламацијске цитокине.
H₁ хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму мења капацитет MSCs да продукују инфламацијске цитокине.
- 2) H₀ хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму не мења капацитет MSCs да продукују имуносупресивне цитокине.

H1 хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму мења капацитет MSCs да продукују имуносупресивне цитокине.

- 3) H0 хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму не утиче на капацитет MSCs за модулацију фенотипа и функције Т лимфоцита.

H1 хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму утиче на капацитет MSCs за модулацију фенотипа и функције Т лимфоцита.

- 4) H0 хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму не утиче на капацитет MSCs за модулацију фенотипа и функције NKT ћелија.

H1 хипотеза: Излагање MSCs дуванском диму утиче на капацитет MSCs за модулацију фенотипа и функције NKT ћелија.

2.4.Методистраживања

2.4.1. Врста студије

Истраживање ће бити реализовано као експериментална студија *in vitro* и на животињама *in vivo*.

2.4.2. Популација која се истражује

Експерименталне животиње

У студији ће се користити мишеви соја C57BL/6, старости 8 до 12 недеља, мушког пола (n=180). Експерименте на животињама одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (01-9588). Животиње ће бити изложене стандардној исхрани са неограниченим приступом храни и води у условима уобичајне температуре (22-25⁰С) и влажности ваздуха (50%) са дневно/ноћним циклусима од 12 часова.

Ћелијска линија мишјих мезенхимских матичних ћелија

У експериментима ће се користити комерцијална линија мишјих мезенхимских матичних ћелија изолованих из костне сржи C57BL/6 мишева (*Gibco/Invitrogen*, кат. број S1502-100). MSCs ће бити култивисане у стандардном медијуму за раст (MSC, DMEM који садржи 2

mmol/l L-глутамина, неесенцијалне аминокиселине (1mmol/l), 100 IU/ml пеницилина G и 100 µg/ml стрептомицина и 10% феталног телећег серума) или у медијуму који је био изложен дуванском диму (MSC^{днм}). Ћелије ће се инкубирати на 37C° у атмосфери 5% CO₂, а у складу са препорукама произвођача (*Gibco/Invitrogen*).

Генерисање надимљеног медијума за култивацију мезенхимских матичних ћелија

DMEM ће се надимљавати у комори за надимљавање *Borgwaldt* LM1 машине (*Borgwaldt, Hamburg, Germany*). Користиће се 1R6F цигарете које ће се користити према ISO 3308:2000 стандардима (запремина удувавања од 35 ml, која се извлачи током 2 s, једном сваког минута са откључаним отворима за вентилацију) или према HCl режиму (*Health Canada Intense*) (запремина удувавања 55 ml, која се извлачи током 2 s, два пута у минути са блокираним отворима за вентилацију). Након инкубирања MSCs у стандардном DMEM медијуму (MSCs) или у надимљеном DMEM медијуму (MSCs^{днм}) у трајању од 48 h, у супернатантима ће се ELISA методом мерити концентрација имуномодулаторних фактора које продукују MSCs.

2.4.3. Узорковање

У циљу изазивања α-GalCer хепатитиса, сви мишеви из експерименталних група ће интраперитонеално примити α-GalCer у дози 50µg/kg ТТ, растворен у 200µL 0.9% NaCl (α-GalCer група).

Животиње ће се сврстати у шест група (три експерименталне (E1-E3) и три контролне групе (K1-K3):

1. E1: C57BL/6 мишеви који ће интраперитонеално примити α-GalCer (50µg/kgТТ) растворен у 200µL 0.9% NaCl (n= 30)
2. E2: C57BL/6 мишеви који ће интраперитонеално примити α-GalCer (50µg/kgТТ) растворен у 200µL 0.9% NaCl, а који ће непосредно након примене α-GalCer-а интраперитонеално примити 5x10⁵MSCs ресуспендованих у 200µL NaCl-а (n= 30)
3. E3: C57BL/6 мишеви који ће интраперитонеално примити α-GalCer (50µg/kgТТ) растворен у 200µL 0.9% NaCl, а који ће непосредно након примене α-GalCer-а интраперитонеално примити 5x10⁵MSCs^{днм} ресуспендованих у 200µL NaCl-а (n= 30)

4. K1: C57BL/6 мишеви, којимаће се интраперитонеално апликовати по 200 μ L NaCl-a (n= 30)
5. K2: C57BL/6 мишеви, којимаће се интраперитонеално апликовати 5x10⁵MSCs ресуспендованих у 200 μ L NaCl-a (n= 30)
6. K3: C57BL/6 мишеви, којимаће се интраперитонеално апликовати 5x10⁵MSCs^{ДИМ} ресуспендованих у 200 μ L NaCl-a (n= 30).

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: мишеви соја C57BL/6 којима је индуковано акутно оштећење јетре и MSCs.

Зависне варијабле:

- степен оштећења јетре
- концентрација цитокина у серуму
- концентрација цитокина у супернатантима
- фенотип имунских ћелија

Одређивање трансминазаи патохистолошка анализа ткивајетре

Мишеви ће бити жртвовани 16 сати након интраперитонеалне апликације α -GalCer-a, након чега ће се изоловати јетраза патохистолошку анализу. Исечци ткива у парафинским калупима користиће се за бојење хематоксилин-еозином. Трансминазе АСТ и АЛТ из серума жртвованих животиња биће одређене применом *Olympus* китова за одређивање трансминаза и коришћењем *AU 400 Olympus chemistry analyzera*.

Мерење цитокина у серуму и супернатантима

Концентрација цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-6 и IL-10) и имуносупресивних фактора које продукују MSCs (TGF- β и HGF) ће се мерити у серуму експерименталних мишева ELISAметодом. Такође, након кокултивације MSCs и MSCs^{ДИМ} (у трајању од 48 h) са α -GalCer-ом стимулисаним NKT ћелијама и CD4+T лимфоцитима стимулисаним конканавалином А, ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача мериће се

концентрација цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-6 и IL-10) и имуносупресивних фактора које продукују MSCs, TGF- β , азотоксид, (енгл. *Nitric oxide*, NO) и кинуренин.

Изолација и анализа фенотипа мононуклеарних ћелија јетре

Након изолације мононуклеара из јетре методом механичке разградње јетре, проточном цитометријом, коришћењем коњугованих моноклонских анти-мишјих антитела за бојење мембранских маркера, односно антитела за интрацелуларно бојење, одредиће се процентуални удео и укупан број различитих популација интрахепатичних имунских ћелија.

2.4.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима концентрације IL-10, TGF- β , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-17, TNF- α , NO и кинуренина. 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 (за серумски ниво IL-10, SE=0.1), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 30 за сваку од група.

2.4.6. Статистичка анализа

Подаци ће бити приказани као Mean \pm SE. За анализу података користиће се параметријски или непараметријски тестови у односу на нормалност расподеле, која ће бити одређена *Kolmogorov-Smirnov* тестом. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износиће $p < 0,05$, док ће статистички веома значајна разлика бити $p < 0,01$. За статистичку обраду свих података користиће се *SPSS* пакет, верзија 20.0. *Microsoft Excel* ће се користити за креирање графика и табела.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Дувански дим значајно утиче на способност MSCs да пролиферишу, диференцирају и мигрирају на место оштећења ткива. Ово истраживање је значајно јер би пружило нова сазнања о утицају дуванског дима на имуномодулаторна својства MSCs, и то пре свега о утицају дуванског дима на капацитет MSCs да редукују оштећење хепатоцита, супримирањем главних ефекторских ћелија у акутном оштећењу јетре. Испитивање ефеката дуванског дима на имуномодулаторно дејство MSCs у моделу хепатитиса који је посредован имунским механизмима, пружило би нови увид у негативно деловање дуванског дима на терапијски потенцијал MSCs у инфламацијским обољењима јетре.

Резултати овог истраживања имају значајан потенцијал за публикување у престижним научним часописима из области транслационе и регенеративне медицине, имунологије и биологије матичних ћелија, и могу бити основа за будућа истраживања сличног циља и дизајна.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

У инфламацијским болестима јетре имунске ћелије узрокују апоптозу хепатоцита, активацију стелатних ћелија, формирање ожиљног ткива чиме се ремети функција јетре. NKT ћелије и Т лимфоцити играју кључну улогу у индукцији прогресији акутног оштећења јетре, тако што у сарадњи са макрофагима и дендритским ћелијама, ефекторским механизмима који укључују рецепторе смрти, систем перфорина/гранзима и секрецију IFN- γ , IL-4 и/или TNF- α индукују апоптозу хепатоцита. MSCs могу да диференцирају у ћелије сличне хепатоцитима, да супримирају инфламацију и регенеришу оболелу јетру. Дувански дим негативно утиче на миграцију, пролиферацију и диференцијацију MSCs. Међутим, утицај дуванског дима на хепатопротективна својства MSCs још увек није испитан. MSCs ће бити култивисане у стандардном медијуму за раст матичних ћелија (MSC) односно у медијуму који је био изложен дуванском диму (MSC^{дим}). Мерењем концентрације цитокина и фактора раста у супернатанту MSCs и MSC^{дим}, испитаће се ефекат дуванског дима на паракрину активност MSCs. Утицај дуванског дима на способност MSC да мењају фенотип и функције имунских ћелија које су одговорне за настанак и прогресију акутног хепатитиса биће испитиван *in vitro* и *in*

in vivo. Мишји модел хепатитиса за чији настанак и прогресију су важни Т лимфоцити и NKT ћелије биће коришћен за *in vivo* испитивање утицаја дуванског дима на хепатопротективна својства MSCs. У експериментима *in vitro*, MSCs и MSC^{днм} ће бити кокултивисане са Т лимфоцитима и NKT ћелијама, а након тога ће се испитивати фенотип Т лимфоцита и NKT ћелија проточном цитометријом. Циљ ове студије је да се утврди утицај дуванског дима на хепатопротективна својства MSCs. За статистичку обраду свих података биће коришћен *SPSS* пакет, верзија 20.0. Ова студија може имати значаја у откривању утицаја дуванског дима на имуномодулаторни и регенеративни капацитет MSCs, па самим тим може понудити нова решења у терапијском приступу пацијената са инфламацијским болестима јетре.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Др Драгица Павловић рођена је 31.01.1991. године, у Крагујевцу. Основну школу је завршила у Топоници, а гимназију у Крагујевцу. Интегрисане академске студије медицине на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписалашколске 2010. године, а дипломирала 2016. са просечном оценом 9,39 и тиме стекла звање доктор медицине. Тренутно је студенткиња треће године Докторских академских студија. У оквиру Интегрисаних академских студија медицине, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, запослена је као сарадник у настави за ужу научну област Генетика, као и на пројекту Министарства науке, просвете и технолошког развоја.

Кандидаткиња је као први аутор објавила један рад у целини у часопису категорије M21, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

Miloradovic D*, Pavlovic D*, Jankovic MG, Nikolic S, Papic M, Milivojevic N, Stojkovic M, Ljubic B. Human Embryos, Induced Pluripotent Stem Cells, and Organoids: Models to Assess the Effects of Environmental Plastic Pollution. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:709183. **M21**

* - оба аутора деле прво ауторство.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Владислав Воларевић, редовни професор Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Медицинска генетика. Предложени ментор испуњава све услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Проф. Др Владислав Воларевић

1. 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 May 9. doi: 10.1002/term.2452. **(M22)**
2. **Volarevic V**, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N. and Lukic M. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A induced hepatitis. *Journal of Hepatology* 2012; 56(1):26-33. **(M21)**
3. Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Djonov V, Lukic ML, **Volarevic V**. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. *Liver Transpl*. 2017;23:1040-1050.**(M21)**
4. Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Jovicic N, Jeftic I, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, **Volarevic V**. Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells – an experimental study. *Transpl Int*. 2018;31:102-115.**(M22)**
5. Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Jovicic N, Acovic A, Harrell CR, Fellabaum C, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, **Volarevic V**. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury. *Liver Transpl*. 2018 May;24(5):687-702.**(M21)**

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Матичне ћелије у биомедицинских наукама

Предмет истраживања се односи на испитивање утицаја дуванског дима на хепатопротективна својства мезенхимских матичних ћелија. Предмет истраживања, циљ и постављене хипотезе и методолошки приступ истраживању су међусобно усклађени, а предложени ментор има научне компетенције које су подударне са предметом истраживања.

5. Научна област чланова комисије

1. **Доц. др Марина Газдић Јанковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник;
2. **Доц. др Александар Арсенијевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Онкологија, члан;
3. **Проф. др Срђан Пешић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан;
4. **НС Данијела Пецарски**, научни сарадник Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, члан;
5. **Доц. др Јована Брадић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан.

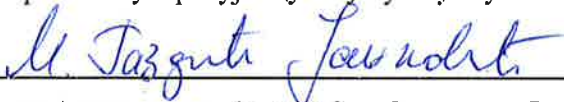



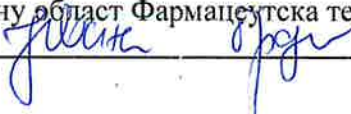
Сви предложени чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Драгице Павловић имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада др Драгице Павловић, комисија закључује да кандидат испуњава услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Драгице Павловић под називом „Утицај дуванског дима на хепатопротективна својства мезенхимских матичних ћелија“

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Доц. др Марина Газдић Јанковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник

2. Доц. др Александар Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Онкологија, члан;

3. Проф. др Срђан Пешић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан;

4. НС Данијела Пецарски, научни сарадник Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, члан;

5. Доц. др Јована Брадић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацевтска технологија, члан.


У Крагујевцу, 25.06.2022. године.