

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-4645/3-7 од 01.07.2011 год, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Марије Миловановић** под називом:

„Улога ST2 молекула у патогенези експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ)“

На основу одлуке Изборног већа, формирана је комисија у саставу:

1. Проф. др Миодраг Лукић, председник, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
3. Ђорђе Миљковић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат **др мед. Марија Миловановић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

А. Лични подаци

Марија Миловановић је рођена 09. маја 1979. године у Крагујевцу где је са одличним успехом завршила основну школу и Прву крагујевачку гимназију, природно-математички смер. Медицински факултет у Крагујевцу је завршила 2006. године са просечном оценом 8,91 Докторске академске студије, смер Имунологија, инфекција, инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу је уписала 2006. године. Усмени докторантски испит из Имунологије, инфекције, инфламације је положила 16. 07. 2008. са оценом 10.

Од фебруара 2008. радила је као Инструктор за практичну наставу на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Од новембра 2008. до септембра 2010. је радила као Сарадник у настави на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Од септембра 2010. до данас ради као асистент на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Од августа 2008. до маја 2011. радила на ФП7 пројекту Европске Уније „Центар за претклиничко испитивање активних супстанци“. Од 1. маја 2010. године је на Специјалистичким студијама из Имунологије на Медицинском факултету у Крагујевцу.

У периоду јун-јул 2009. боравила је на Институту Кири у Паризу на стручном усавршавању у лабораторији проф. Филипа Шатријеа.

Члан је Друштва имунолога Србије.

Б. Научно истраживачки рад

Кандидат, др. мед. Марија Миловановић се активно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за клиничку и експерименталну имунологију, Медицинског факултета у Крагујевцу. Континуирани научно-истраживачки рад огледа се у учешћу на:

међународним научним пројектима:

1. ФП7 пројекту Европске Уније „Центар за претклиничко испитивање активних супстанци“,

пројектима Министарства науке Републике Србије:

2. „Молекулске детерминанте урођене имуности у аутоимунским болестима и канцерогенези (број пројекта: ON175069)“,

3. „Развој инфраструктуре за приоритетна поља науке (број пројекта: ON175103)“,

Јуниор пројектима Медицинског факултета у Крагујевцу:

4. „ЈП 2/09 Имуномодулација хроничних инфламаторних болести (01-1772) (руководилац пројекта)“,

5. „ЈП 07/10 Испитивање механизма цитотоксичности комплекса злата, платине и рутенијума на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије и *in vivo* ефеката на мишћем моделу хроничне лимфоцитне леукемије (01-192)“,

6. „ЈП 11/10 Испитивање улоге и значаја ST2 молекула у Конканавалин А индукованом оштећењу јетре (01-559)“,

7. „ЈП 15/10 Испитивање улоге и значаја STAT3 молекула у експерименталном моделу тумора дојке (01-1207)“,

8. „ЈП 24/10 Утицај природних и модификованих имуноглобулина на функцију дендритских ћелија у ЕАЕ (01-8085)“,

9. „ЈП 26/10 Испитивање цитотоксичности глас јономер цемента на хуманим мезенхималним матичним ћелијама (01-8102)“.

У току студија објавила је укупно 10 радова, од чега је 8 у целини публиковано у научним часописима међународног значаја и 2 рада у целини публикована у националном часопису, као и већи број сажетака на међународним научним скуповима.

В. Подаци о објављеним радовима

B.1. Радови објављени у научним часописима међународног значаја (категорија M20)

1.1 Vladislav Volarevic, Marina Mitrovic, **Marija Milovanovic**, Ivanka Zelen, Ivana Nikolic, Slobodanka Mitrovic, Nada Pejnovic, Nebojsa Arsenijevic and Miodrag L. Lukic Protective Role of IL-33/ST2 Axis in Con A-Induced Hepatitis. J Hepatol. 2011 May 18. [Epub ahead of print]

M21 8 бодова

1.2 Vujić JM, Cvijović M, Kaluderović GN, **Milovanović M**, Zmejkovski BB, Volarević V, Arsenijević N, Sabo TJ, Trifunović SR. Palladium(II) complexes with R2edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells Eur J Med Chem. 2010;45(9):3601-6.

M21 8 бодова

1.3. **Milovanović M**, Djeković A, Volarević V, Petrović B, Arsenijević N, Bugarcic ZD. Ligand substitution reactions and cytotoxic properties of [Au(L)Cl₂](+) and AuCl₂(DMSO)₂] + complexes (L=ethylenediamine and S-methyl-l-cysteine). J Inorg Biochem. 2010;104(9):944-9.

M21 8 бодова

1.4. Volarevic V, **Milovanovic M**, Djekovic A, Petrovic B, Arsenijevic N, Bugarcic Z. The cytotoxic effects of some selected gold(III) complexes on 4T1 cells and their role in the prevention of breast tumor growth in BALB/c mice. J BUON 2010; 15:768-773.

M23 3 бода

1.5. B. Ljujic, G. Radosavljevic, I. Jovanovic, S. Pavlovic, N. Zdravkovic, **M. Milovanovic**, Lj. Acimovic, M. Knezevic, D. Bankovic, D Zdravkovic and N. Arsenijevic. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. Archives of Medical Research 2010; 41:182-189.

M22 5 бодова

1.6. Radosavljevic G, Ljujic B, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, **Milovanovic M**, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumour marker in patients with colorectal carcinoma. Neoplasma 2010; 57(2): 135-144.

M23 3 бода

B.2. Зборници међународних научних скупова (категорија M30)

2.1 **Milovanovic M**, Vassilev Tch, IvanovJ, Arsenijevic N and Lukic ML. Heme exposed IvIgs enhances their downregulatory capacity in EAE. 7th International congress on autoimmunity, Ljubljana Slovenia, May 2010.

M34 0.5 бодова

2.2. Vujić J, **Milovanović M**, Volarević V, Arsenijević N, Cvijović M, Trifunović S. Synthesis, characterization and antitumoral activity of the Platinum(II) complex with O,O'-diethyl-ethylenediamine-N,N'-DI-(S,S)-2(4-methyl)-pentanoate ligand. Eleventh annual conference „Yucomat 2009” Herceg Novi August 31-September 4, 2009, Abstract book page191.

M34 0.5 бодова

B.3. Часописи националног значаја (категорија M50)

3.1. Volarevic V, **Milovanovic M**, Arsenijevic N, Lukic M. The new semi-quantitative method for determination of liver damage after Concanavalin A administration. Ser J of Exp and Clin Res. 2010; 11: 45-48.

M52 1.5 бод

B.4. Зборници скупова националног значаја категорија (M60)

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

„Улога ST2 молекула у патогенези експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ)“

Предмет:

Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис је експериментални модел за проучавање мултипле склерозе. Болест се индукује у осетљивих сојева апликацијом компоненти мијелинског омотача са, или без додатака адјуванса, што активира мијелин специфичне лимфоците који пролазе хематоенцефалну баријеру, реактивирају се и индукују инфламацију. У оштећењу мијелинског омотача учествују ћелије и специфичне и неспецифичне имуности. И поред бројних модела на различитим животињама који служе за проучавање мултипле склерозе, комплетна етиопатогенеза болести још није разјашњена. BALB/c мишеви су резистентни на индукцију ЕАЕ што је повезано са алелом H-2d који је присутан код ових мишева за разлику од C57BL/6 мишева који имају H-2b алел. Релативна резистенција на индукцију ЕАЕ нуди могућност проучавања патогенезе аутоимунских процеса и евентуалних заштитних механизма. Тако је показано да блокада CTLA-4 и PD-L молекула и IL-4 специфичним антителом омогућава развој ЕАЕ у BALB/c мишева који се сматрају релативно резистентним на индукцију болести.

Молекул ST2 је мембрански гликопротеин, члан фамилије рецептора за интерлеукин 1, IL-1R и јавља се у два облика, као солубилни (sST2) и мембрански (ST2L). ST2L је експримиран на површини Th2 лимфоцита, мастоцита, базофила, еозинофила, моноцита, дендритских и NK ћелија. ST2 је експримиран у централном нервном систему, астроцитима, микроглији. Лиганд за ST2 је IL-33, новиооткривени члан IL-1 цитокине фамилије, а IL-33/ ST2 сигнални пут појачава Th2 имунски одговор. Макрофаги ST2 *knock-out* мишева продукују значајно више IL-12, IL-6 и TNF- α након стимулације агонистима TLR-a, док ST2 молекул инхибира сигнале са TLR-a.

Одсуство ST2 молекула у BALB/c мишева би могло да уклони резистенцију ових мишева на индукцију ЕАЕ, што до сада није испитано. Основни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај ST2 молекула у патогенези ЕАЕ индукованог MOG 35-55 пептидом. Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја BALB/c и C57BL/6 (*wild type*) и

нокаут мишеве (ST2^{-/-} на BALB/c подлози), женског пола, старости од 8 до 10 недеља. EAE ће се индуковати применом MOG 35-55 пептида у CFA и пертусис токсина. Анализом хистолошких препарата, мерењем продукције цитокина (ELISA техником и мерењем интрацелуларних цитокина проточном цитометријом), анализом моноклеарног инфилтрата у CNS-у и функционалним испитивањем макрофага испитаће се утицај и значај делеције гена за ST2 у патогенези EAE. Очекује се да ће ST2^{-/-} мишеви на BALB/c подлози развити EAE што може да укаже да би евентуална модулација ST2 сигналног пута могла да има примену у лечењу мултипле склерозе.

Хипотезе:

- Делеција ST2 молекула чини BALB/c мишеве осетљивим на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.
- Основа осетљивости BALB/c мишева на индукцију EAE је последица појачане активације макрофага у одсуству ST2 молекула

2.3. Подобност кандидата

Кандидат, др. мед. Марија Миловановић положила је усмени докторски испит 16. 07. 2008. године са оценом 10 (десет). У току студија објавила је 8 радова у научним часописима међународног значаја, од чега један рад у ком је први аутор, и два рада у националним часописима чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

EAE је експериментални модел за проучавање мултипле склерозе и сматра се да у патогенези ове болести, као и мултипле склерозе, кључну улогу имају Т лимфоцити. Међутим, активација Т лимфоцита на периферији зависи од функције антиген презентујућих ћелија, а у ефекторској фази болести, у процесу оштећења мијелинског омотача важну улогу имају различите ћелије неспецифичне имуности, па у ствари, развој болести зависи од функције различите ћелија. BALB/C мишеви су релативно резистентни на индукцију EAE, али је показано да блажа форма болести може да се развије третирањем мишева моноклонским антителима: анти-CTLA-4 анти-PD-L и анти-IL-4. Нема података у литератури о утицају експресије/одсуства ST2 молекула на BALB/C основи на развој EAE.

Молекул ST2 је члан Toll/IL-1 супефамилије рецептора и јавља се у две форме: солубилна (sST2) и мембранска (ST2L). ST2L је експримиран на површини Th2 лимфоцита, као и мастоцита, базофила, еозинофила, дендритских ћелија и NK ћелија. Специфични лиганд за ST2L је IL-33, новиооткривени члан IL-1 цитокинске фамилије, који везујући се за овај рецептор индукује секрецију IL-4, IL-5 и IL-13, што појачава Th2 имунски одговор. Инхибиција ST2/IL-33 сигналног пута (делеција гена за ST2) утиче на појачану продукцију Th1 цитокина и тако утиче на ток инфективних, алергијских и аутоимунских болести. Макрофаги који не експримирају ST2 молекул продукују значајно више проинфламаторних цитокина IL-12, IL-6 и TNF- α након стимулације агонистима TLR-a, док ST2 молекул инхибира сигнале са TLR-a. ST2L је експримиран на површини дендритских ћелија и сигнали са овог молекула, индиректно преко GM-CSF-a, подстичу развој

дендритских ћелија, али спречавају њихово фенотипско и функционално сазревање. Дендритске ћелије третиране интерлеукином-33 су фенотипски и функционално незреле, са смањеном осетљивошћу на TLR лиганде и смањеним капацитетом активације наивних Т лимфоцита. Постоје подаци о израженој експресији IL-33 у ткиву централног нервног система у различитим ћелијама, али не постоји консензус о утицају IL-33 на испољавање ЕАЕ. Значај ST2 молекула за функцију антиген презентујућих ћелија, макрофага и дендритских ћелија, у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса није до сада испитан као ни утицај одсуства ST2 у централном нервном систему на ток инфламаторних реакција у том ткиву.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај сигнала са ST2 молекула у патогенези експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

У складу са основним циљем постављени су следећи специфични циљеви.

1. На основу процене клиничке слике и хистолошке анализе утврдити утицај одсуства гена за ST2 рецептор на развој ЕАЕ у резистентном соју мишева.
2. Испитати утицај експресије гена за ST2 рецептор на фенотипске карактеристике мононуклеара слезине и лимфних чворова BALB/c мишева са индукованим ЕАЕ и утврдити постојање евентуалне разлике у односу на осетљив сој мишева C57Bl/6.
3. Испитати састав инфилтратата у централном нервном систему BALB/c мишева и утврдити постојање евентуалне разлике у односу на осетљив сој мишева C57Bl/6.
4. Упоредити цитокинске профиле имунизованог резистентног соја, имунизованог резистентног соја са делецијом ST2 гена и остетљивог соја са индукованим ЕАЕ.
5. Испитати експресију ST2 молекула и IL-33 у ЦНС-у пре и после индукције ЕАЕ у осетљивих и резистентних мишева.
6. Испитати утицај ST2 молекула на пролиферацију Т лимфоцита
7. Испитати како одсуство ST2 гена утиче на матурацију и функцију дендритских ћелија.
8. Испитати како одсуство ST2 гена утиче на активацију макрофага, продукцију цитокина и функционалне карактеристике.

2.6. Веза са досадашњим истраживањима

На основу до сада публикованих студија, зна се да је експресија ST2 молекула као и IL-33 који се сматра лигандом за овај молекул, веома изражена у централном нервном систему, а ефекти IL-33 у CNS-у могу да буду двојаки и про- и анти-инфламаторни. Постоје подаци о развоју преобладајућег Т1 имунског одговора у CNS-у BALB/c ST2^{-/-} мишева и о већој осетљивости на индукцију различитих

инфламаторних болести. ST2 молекул је експримиран и на различитим ћелијама имунског система и показано је да његова делеција утиче на ток фулминантног хепатитиса индукованог у мишева. Међутим улога овог молекула у патогенези ЕАЕ је врло слабо испитана. Уколико докажемо да ST2 молекул има улогу у патогенези ЕАЕ, наши резултати могу да укажу на могућност терапијске модулације сигнала са ST2 молекула у терапији мултипле склерозе људи.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње: Као експерименталне животиње користе се мишеви соја BALB/c и C57BL/6 (*wild type*) и нокаут мишеви (ST2^{-/-} на BALB/c подлози), женског пола, старости од 8 до 10 недеља. Експерименталну групу чине ST2^{-/-} мишеви на BALB/c подлози (Е), а контролне групе чине BALB/c (К1) и C57BL/6 (К2) (*wild type*) мишеви. Све експерименталне и контролне групе у истраживању обухватиће по 50 животиња.

Индукција ЕАЕ: Болест ће се индуковати субкутаном применом MOG 35-55 пептида (300 µg) раствореног у 100 PBS-а помешаног са 100 µl комплетног Фројндовога адјуванса (CFA) са додатком *M. tuberculosis* тако да садржи укупно 800 µg бактерије. Мишеви ће првог и трећег дана и индукције примити интраперитонеалну инјекцију пертусус токсина (300 ng у 100 µl физиолошког раствора).

Праћење клиничког тока ЕАЕ: Испољавање болести ће се пратити свакодневно на основу следећег критеријума: 0-нема клиничког испољавања болести; 0.5-парцијална парализа репа; 1-парализа репа; 2-атаксија или пареза задњих екстремитета; 2.5-једна задња нога парализована; 3-обе задње ноге парализоване; 3.5 парализа задњих ногу и пареза предњих ногу, или парализа 3 екстремитета; 4-парализа сва 4 екстремитета; 5-смрт и изражаваће се у виду средњег клиничког скорa.

Хистолошка анализа: Након жртвовања мишева, направити се парафински исечци мозга и кичмене мождине. Хематоксилином и еозином обојени препарати служиће за одређивање степена инфилтрације нервног ткива. Користиће се следећи критеријум за процену инфилтрације: 0-нема инфилтришућих ћелија; 1-неколико појединачних инфламаторних ћелија; 2-организовани периваскуларни инфилтрати; 3-периваскуларна инфилтрација са ширењем у субарахноидни простор и паренхим CNS-а; 4- изражена субарахноидна и паренхимска инфилтрација.

Одређивање серумског нивоа цитокина: Нивои про- и анти- инфламаторних цитокина ће се одређивати стандардном ELISA техником, коришћењем ELISA сетова специфичних за мишје цитокине (R&D Systems Minneapolis, MN), према упутствима произвођача.

Изолација мононуклеарних ћелија из регионалних лимфних чворова, слезине и ЦНС-а: Након жртвовања мишева у фази индукције болести екстирпираће се регионални лимфни чворови и слезина и пропуштањем кроз ћелијско сито (*cell strainer*, BD Pharmingen, USA) добиће се једноћелијска суспензија (мононуклеари лимфоног чвора и спленцити). Мононуклеари из нервног ткива ће се изоловати на градијенту перкола. Коришћењем анти-CD4 (*Invitrogen*) магнетима коњугованих антитела и DC *Enrichment Kit-a* (*Invitrogen*) изоловаће се CD4⁺ Т лимфоцити и

дендритске ћелије. Адхерентне ћелије (моноцити) изоловаће се лепљењем на пластику, након 2-часовне инкубације.

Фенотипизација изолованих моноклеара лимфних чворова, спленоцита и ЦНС-а: Проточном цитометријом, коришћењем BD FACS *Calibur-a*, WINMDI програма и анти-мишјих антитела, одредиће се проценат и укупан број CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т лимфоцита, CD19⁺ В лимфоцита, NK1.1⁺ (C57BL/6), NKp46⁺ (BALB/c) NK ћелија, F4/80⁺ и CD11b⁺ макрофага, CD206⁺ и CD273⁺ алтернативно активираних макрофага CD11c⁺ дендритских ћелија у лимфним чворовима и слезини експерименталних и контролних животиња. Коришћењем анти-мишјих антитела за мерење интрацелуларних цитокина проточном цитометријом ће се одредити релативни односи Т лимфоцита, макрофага и дендритских ћелија позитивних на анти- и про-инфламаторне цитокине.

Одређивање нивоа цитокина у супернатантима: Т лимфоцити изоловани из слезине, лимфних чворова и централног нервног система ће се култивисати 48 сати у присуству MOG 35-55 пептида или конканавалина А или чистог медијума, а макрофаги и дендритске ћелије ће се култивисати у присуству липополисахарида или TLR-2 агонисте или чистог медијума. У супернатантима ће се одредити нивои про- и анти-инфламаторних цитокина стандардном ELISA техником, коришћењем ELISA сетова специфичних за мишје цитокине (R&D Systems Minneapolis, MN), према упутствима произвођача.

Пролиферација CD4⁺ Т лимфоцита: изоловани Т лимфоцити ће се култивисати у присуству MOG 35-55 пептида (10 µg/mg суспензије) 72 сата и пролиферација ће се одредити МТТ тестом. Испитаће се и пролиферација Т лимфоцита у присуству изолованих дендритских ћелија и адхерентне фракције моноклеара и MOG 35-55 пептида, такође МТТ тестом.

Испитивање макрофага: у моноклеарима изолованим из лимфних чворова, слезине и ЦНС-а проточном цитометријом испитаће се односи М1 (F4/80⁺ CD40⁺ и CD11b⁺ CD40⁺) и М2 (F4/80⁺ CD206⁺ CD273⁺ и CD11b⁺ CD206⁺ CD273⁺) макрофага и продукција цитокина у овим ћелијама (IL-1, IL-6, IL-12, TNF, IL-10).

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима средњег клиничког и хистолошког скорa и серумске концентрације IFN γ, TNF, IL-17, IL-4 и IL-10, односно процента моноклеарних ћелија изолованих из CNS-а 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. С обзиром да је за серумски ниво IL-10 нађена најмања разлика између експерименталне и контролних група, ова вредност је коришћена за израчунавање величине узорка. Разлика у вредностима IL-10 у серуму међу групама износила је 0.06 ng/ml, а стандардна девијација 0.1 и утврђени број експерименталних животиња према групама износи 36 за сваку од група, али користиће се по 50 мишева у свакој групи. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 13.

Врста студије

Експериментална студија

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користимо параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Ова студија би по први пут требало да испита да ли ST2 молекула утиче на развој ЕАЕ у резистентном соју мишева. С обзиром да је показано да одсуство овог молекула утиче на развој дијабетес мелитуса у резистентних BALB/C мишева, очекујемо да ће се и у ST2 -/- BALB/C мишева развити ЕАЕ. Макрофаги без ST2 молекула показују изразиту продукцију проинфламаторних цитокина, IL-12, IL-6 и TNF- α , па очекујемо да ће поларизација у правцу M1 макрофага имати улогу у развоју ЕАЕ. Претпоставља се да ће одсуство ST2 молекула имати утицаја и на дендритске ћелије, у виду продукције проинфламаторних цитокина и активације и појачане пролиферације енцефалитогених ћелија.

Очекује се да ће овим испитивањем успети да се открију нови аспекти патогенезе ЕАЕ који ће указати на евентуално нове терапијске мере у лечењу мултипле склерозе кроз модулацију сигнала са ST2 молекула.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи мишеве делецијом гена за ST2 молекула, испитивањем клиничке слике, хистолошком анализом препарата централног нервног система, проточном цитометријом, ELISA-ом, имунохистохемијом и Western blot-ом испитаће се улога ST2 молекула у развоју експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса. Испитаће се утицај ST2 молекула на фенотип и укупан број мононуклеарних ћелија које инфилтришу CNS, анализираће се цитокински профил ових ћелија и одредити нивои серумских цитокина, испитаће се утицај овог молекула на функцију дендритских ћелија и макрофага и експресију IL-33 у CNS-у пре и после индукције болести.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **Проф. др Миодрага Лукића**, који је професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Проф. др Миодраг Лукић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом, као и искуство и остварене резултате у развоју научно-наставног подмлатка.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, преседник, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
3. Ђорђе Миљковић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, за ужу научну област Имунологија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Марија Миловановић, испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета и законом о универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације;
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна;
3. Комисија сматра да ће докторска дисертација кандидата др мед. Марије Миловановић указати да постоје статистички значајни показатељи да сигнали са ST2 молекула играју важну улогу патогенези ЕАЕ.
4. Комисија предлаже Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Марије Миловановић, под називом **„Улога ST2 молекула у патогенези експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ)“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

2. Проф. др Небојша Арсенијевић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије

3. Ђорђе Миљковић, члан, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду

У Крагујевцу, 06.07.2011 године