

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-165/3-3 од 19.01.2011 год, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Владислава Воларевића** под називом:

**„IL33/ST2 сигнални пут и галектин 3 у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса“**

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

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
2. Проф. др Миодраг Лукић, члан, професор емеритус Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,
3. Проф. др Миодраг Чолић, члан, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија.

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. Владислав Воларевић**, 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**

Владислав Воларевић је рођен 09. септембра 1979 године у Нишу где је са одличним успехом завршио основну школу „Свети Сава“ и гимназију природно-математичког смера „Стеван Сремац“ као носилац дипломе „Вук Караџић“ за постигнут успех у основној и средњој школи. Медицински факултет у Нишу је завршио 2006. године са просечном оценом 9,81.

Докторске академске студије, смер Имунологија, инфекција, инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу је уписао 2006. године. Усмени докторантски

испит из Имунологије, инфекције, инфламације је положио 16. 07. 2008, добивши оцену 10.

Од фебруара 2008 радио је као Инструктор за практичну наставу на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Од новембра 2008 до септембра 2009 је радио као Сарадник у настави на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Од септембра 2009 до данас ради као асистент на предмету Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету у Крагујевцу.

Од августа 2008 до данас ради 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 августу 2008 године Владислав Воларевић је боравио на стручном усавршавању из области савременог вођења наставе из Имунологије кроз рад у малој групи, на Универзитету Калифорнија Сан Франциско-UCSF, а практичан рад из Имунологије је обављао у лабораторији проф. Абдула Абаса у Универзитету Калифорнија Сан Франциско-UCSF.

У периоду јун-јул 2009 боравио је у Институту Кири у Паризу на стручном усавршавању из Имунологије у лабораторији проф. Себастијана Амигорене.

Током августа 2009 године је у Минеаполису успешно завршио „Напредни курс из Имунологије-Advanced Immunology Course“ који је организовало Америчко удружење имунолога.

Члан је Друштва имунолога Србије.

## **Б. Научно истраживачки рад**

Кандидат, др. мед. Владислав Воларевић 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 мишићем 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 објавио је укупно 6 радова, од чега су 5 у целини публикована у научним часописима међународног значаја и 1 рад у целини публикован у националном часопису, као и већи број сажетака на међународним научним скуповима.

## **В. Подаци о објављеним радовима**

### **В.1. Радови објављени у научним часописима међународног значаја (категорија М20)**

1.1. **Volarevic V**, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Mesenchymal Stem Cell Treatment of Complications of Diabetes Mellitus. Stem Cells. 2010 Nov 9. [у штампи, DOI: 10.1002/stem.556]  
**М21 8 бодова**

1.2. Vujić JM, Cvijović M, Kaluderović GN, Milovanović M, Zmejkovski BB, **Volarević V**, Arsenijević N, Sabo TJ, Trifunović SR. Eur J Med Chem. 2010;45(9):3601-6.  
**М21 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)Cl<sub>2</sub>](+) and [AuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> complexes (L=ethylenediamine and S-methyl-L-cysteine). J Inorg Biochem. 2010;104(9):944-9.  
**М21 8 бодова**

1.4. **Volarevic V**, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. Autoimmunity. 2010; 43(4):255-63.  
**М22 5 бодова**

1.5. **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.  
**М23 3 бода**

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

2.1. Lukic M, Mensah Brown E, **Volarevic V**, Arsenijevic N, Shanin A. Galectin-3 is required for optimal stimulation of autoreactive T cells. 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 page 191.

**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:

„IL33/ST2 сигнални пут и галектин 3 у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса"

#### Предмет:

Конканавалин А (Con A) је лектин који *in vitro* индукује поликлоналну активацију Т лимфоцита, а након интравенске инјекције, у року од 24 часа, узрокује акутно и тешко оштећење јетре које по клиничким, биохемијским и хистолошким карактеристикама одговара акутном, фулминантном хепатитису код људи, због чега Con A-индуковано оштећење јетре мишева представља један од експерименталних модела за проучавање имунских механизма одговорних за патогенезу фулминантног хепатитиса људи. Иако је патогенеза Con A индукованог хепатитиса још увек неразјашњена, познато је да су: оштећење синусоидалних ћелија јетре, масовна миграција поликлонално активираних лимфоцита, и про-инфламаторни цитокини Th1 и/или Th17 имунског одговора, одговорни за апоптозу и некрозу хепатоцита у овом моделу фулминантног хепатитиса. ST2 рецептор и галектин 3 су молекули експримирани на ћелијама јетре и на ћелијама имунског система, а укључени су у процесе миграције леукоцита ка месту запаљења (галектин 3), односно поларизације имунског одговора (ST2). Њихова улога у патогенези Con A хепатитиса, као експерименталног модела фулминантног хепатитиса,

до сада није испитивана. Основни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај IL-33/ST2 сигналног пута и Gal-3 у патогенези Con A индукованог хепатитиса. Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја BALB/c и C57BL/6 (wild type) и нокаут мишеве (ST2<sup>-/-</sup> на BALB/c подлози и Gal-3<sup>-/-</sup> на C57BL/6 подлози), мушког пола, старости од 8 до 10 недеља. Оштећење јетре ће се индуковати интравенском апликацијом Con A у дози од 12мг/кгТТ, претходно раствореног у 200μL NaCL-а. Праћењем нивоа трансминаза, хистологије, квантитативним одређивањем некрозе хепатоцита, мерењем продукције цитокина (ELISA техником и мерењем интрацелуларних цитокина проточном цитометријом), анализом моноклеарног инфилтрата у јетри (проточна цитометрија) испитаће се утицај и значај делеције гена за ST2 и Gal-3 у патогенези Con A индукованог хепатитиса. Очекујемо да ће оштећење јетре након примене Конканавалина А бити значајно теже код ST2<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са BALB/c wild type, док код Gal-3<sup>-/-</sup> мишева очекујемо мање оштећење јетре у поређењу са C57BL/6 wild type мишевима. Очекујемо да ћемо указати на анти-апоптотски ефекат интравенске примене IL-33 и да ће IL-33 испољити превентивни ефекат манифестован значајно мањом некрозом хепатоцита. Очекујемо да IL-33 и Gal-3 могу да превенирају или ублаже оштећење јетре у Con A хепатитису, што може указати на могућност терапијске примене рекомбинатног IL-33 и синтетских инхибитора галектина 3 у терапији фулминантног хепатитиса људи.

#### **Хипотезе:**

1. Примена рекомбинантног IL-33 може да превенира или ублажи симптоме болести у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса.
2. Одсуство гена за ST2 молекула чини BALB/c мишеве осетљивијим на Конканавалином А индуковано оштећење јетре.
3. Одсуство гена за галектин-3 чини C57BL/6 мишеве релативно резистентним на Конканавалином А индуковано оштећење јетре.

#### **2.3. Подобност кандидата**

Кандидат, др. мед. Владислав Воларевић положио је усмени докторски испит 16. 07. 2008. године са оценом 10 (десет). У току студија објавио је пет радова у научним часописима међународног значаја, од чега три рада у којима је први аутор, и један рад у националним часописима у којем је први аутор чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Конканавалин А (Con A) је лектин који *in vitro* индукује поликлоналну активацију Т лимфоцита, а након интравенске инјекције, у року од 24 часа, узрокује акутно и тешко оштећење јетре које по клиничким, биохемијским и хистолошким карактеристикама одговара акутном, фулминантном хепатитису код људи, због чега Con A-индуковано оштећење јетре мишева представља експерименталан модел за проучавање имунских механизма одговорних за патогенезу фулминантног хепатитиса људи. Con A се снажно везује за мембрану синусоидалних, ендотелних ћелија јетре и хепатоцита и оштећује их. Оштећени хепатоцити реагују са поликлонално (конканавалином А) активираним Т лимфоцитима што резултира снажним имунским одговором у јетри са последичном апоптозом или некрозом хепатоцита. Ефекторске ћелије, одговорне за некрозу хепатоцита су Т лимфоцити, макрофаги и „natural killer T“ (NKT) ћелије које директно (ћелијским контактом) или индиректно (продукцијом про-инфламаторних цитокина: фактора некрозе тумора (TNF- $\alpha$ ), интерлеукина 1 (IL-1), интерферона гама (IFN- $\gamma$ ), интерлеукина 2 (IL-2), интерлеукина 6 (IL-6) оштећују хепатоците (4-7). Међу претходно најбројаним цитокинима, сматра се да кључна улога у некрози хепатоцита припада TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , цитокинима доминантно присутним у Th1 имунском одговору. Иако је патогенеза Con A индукованог хепатитиса још увек неразјашњена, познато је да су: оштећење синусоидалних ћелија јетре, масовна миграција поликлонално активираних лимфоцита, и про-инфламаторни цитокини Th1 и/или Th17 имунског одговора, одговорни за апоптозу и некрозу хепатоцита у овом моделу фулминантног хепатитиса.

ST2 рецептор и галектин 3 су молекули експримирани на ћелијама јетре и на ћелијама имунског система одговорним за некрозу хепатоцита и укључени су у процес миграције леукоцита ка месту запаљења (галектин 3), односно поларизације имунског одговора (ST2).

ST2 молекул је члан Toll/IL-1 суперфамилије рецептора и јавља се у две форме: солубилној (sST2) и као мембрански рецептор (ST2L) присутан на мембрани мастоцита, Т лимфоцита, макрофага, NKT ћелија. Специфични лиганд за ST2L је интерлеукин 33 (IL-33), члан IL-1 цитокинске фамилије, који везујући се за овај рецептор индукује секрецију IL-4, интерлеукина 5 (IL-5), интерлеукина 10 (IL-10) и интерлеукина 13 (IL-13) што појачава Th2 имунски одговор. Синтеза и секреција проинфламаторних цитокина доминантно присутних у Th1 имунском одговору се може супримирати активацијом IL-33/ST2 сигналног пута.

Галектин-3 (Gal-3) је лектин, гликопротеин са високим афинитетом за  $\beta$ -галактозиде, присутан у једру, цитоплазми, митохондријама, на површини ћелија, а у секретованом облику се налази и у ткивним течностима. У зависности од локализације и везивањем за различите лиганде регулише ћелијску пролиферацију, диференцијацију и апоптозу. Изузетно је важан у миграцији ћелија. Учествоје у адхезивним процесима, у међућелијском контакту, а функционише и као „мост” између ћелија и екстрацелуларног матрикса. Gal-3 је експримиран на макрофагима, дендритским ћелијама, активираним Т и В лимфоцитима.

Улога IL-33/ST2 сигналног пута и Gal-3 у Con A индукованом хепатитису још увек није испитана.

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

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај IL-33/ST2 сигналног пута и Gal-3 у патогенези Con A индукованог хепатитиса.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Применом биохемијских тестова и квантитативне хистологије утврдити утицај одсуства гена за ST2 рецептор на оштећење јетре у Con A индукованом хепатитису.
2. Испитати утицај експресије гена за ST2 рецептор на фенотипске карактеристике интрахепатичних лимфоцита у Con A индукованом хепатитису.
3. Испитати утицај IL-33/ST2 сигналног пута на цитокински профил у моделу фулминантног хепатитиса.
4. Испитати да ли примена рекомбинантног IL-33 може да превенира или ублажи симптоме болести у моделу фулминантног хепатитиса.
5. Применом биохемијских тестова и квантитативне хистологије утврдити утицај одсуства гена за Gal-3 на оштећење јетре у Con A индукованом хепатитису.
6. Испитати утицај експресије гена за Gal-3 на фенотипске карактеристике интрахепатичних лимфоцита у Con A индукованом хепатитису.
7. Испитати утицај експресије Gal-3 на цитокински профил у моделу фулминантног хепатитиса.

## 2.6. Веза са досадашњим истраживањима

На основу до сада публикованих студија, зна се да су ST2 рецептор и галектин 3 присутни на мембрани ћелија које су укључене у патогенезу Cop A хепатитиса (Т лимфоцити, макрофаги, NK и NKT ћелије и да је галектин 3 експримиран у јетри, као и да активација IL-33/ST2 сигналног пута блокира дејство про-инфламаторних цитокина одговорних за апоптозу и некрозу хепатоцита. Међутим, нема литералних података ни о улози IL-33/ST2 сигналног пута нити о улози галектина 3 у патогенези Cop A индукованог и фулминантног хепатитиса, па би наше истраживање требало да укаже на значај и објасни улогу ових молекула у патогенези фулминантног хепатитиса.

Уколико докажемо да интерлеукин 33 и галектин 3 могу да превенирају или ублаже оштећење јетре у Cop A хепатитису, наши резултати могу указати на могућност терапијске примене рекомбинатног IL-33 и синтетских инхибитора галектина 3 у терапији фулминантног хепатитиса људи.

## 2.7. Методе истраживања

**Експерименталне животиње:** Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја BALB/c и C57BL/6 (wild type) и нокаут мишеве (ST2<sup>-/-</sup> на BALB/c подлози и Gal-3<sup>-/-</sup> на C57BL/6 подлози), мушког пола, старости од 8 до 10 недеља. Све експерименталне и контролне групе у истраживању садржаће по 50 мишева.

**Експерименталне групе (Е1, Е2, Е3):** Е1: 50 BALB/c „wild type” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити Cop A (12мг/кгТТ) раствореног у 200μL NaCL. Е2: 50 BALB/c ST2<sup>-/-</sup> „knockout” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити Cop A (12мг/кгТТ) раствореног у 200μL NaCL-а.

Е3: 50 BALB/c „wild type” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити IL-33 (10μg/ml, 40μg/kg) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 24 h пре примене Cop A (12мг/кгТТ) раствореног у 200μL NaCL-а.

**Контролне групе (К1 и К2):** К1: 50 BALB/c „wild type” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити 200μL NaCL-а.

К2: 50 BALB/c ST2<sup>-/-</sup> „knockout” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити 200μL NaCL-а.

**Експерименталне групе (Е4 и Е5):** Е4: 50 C57BL/6 „wild type” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити Cop A (12мг/кгТТ) раствореног у 200μL NaCL-а.

Е5: 50 C57BL/6 Gal-3<sup>-/-</sup> „knockout” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити Cop A (12мг/кгТТ) раствореног у 200μL NaCL-а.

**Контролне групе (К3 и К4):** К3: 50 C57BL/6 „wild type” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити 200μL NaCL-а.



K4: 50 C57BL/6 Gal-3<sup>-/-</sup>, „knockout” мужјака старости 8-10 недеља који ће интравенски примити 200 $\mu$ L NaCL-a.

**Конканавалином А индуковано оштећење јетре:** Мишевима из експерименталних група ће се индуковати оштећење јетре интравенском апликацијом Con A у дози од 12мг/кгТТ, претходно раствореног у 200 $\mu$ L NaCL-a. Мишеви из контролних група ће примити по 200 $\mu$ L NaCL-a.

**Испитивање терапијског ефекта интерлеукина 33:** Мишеви из E3 групе ће једнократно интравенски примити IL-33 (10 $\mu$ g/ml, 40 $\mu$ g/kg) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 24 h пре примене Con A (12мг/кгТТ). Праћењем нивоа трансаминаза, хистологије, продукције цитокина, анализом мононуклеарног инфилтрата у јетри и испитивањем разлике у експресији апоптотских и анти-апоптотских протеина уочиће се постојање терапијског ефекта IL-33 у Con A индукованом оштећењу јетре.

**Испитивање улоге галектина 3 у Con A индукованом оштећењу јетре:** Поређењем нивоа трансаминаза, хистолошког оштећења јетре, продукције цитокина, анализом мононуклеарног инфилтрата у јетри између мишева E4 и E5 група утврдиће се да ли галектин 3 има значајну улогу у доласку лимфоцита у јетру након интравенске примене Con A.

**Одређивање трансаминаза:** За мерење трансаминаза експерименталне животиње биће жртвоване 24 часа након интравенског давања Con A (експерименталне групе), односно NaCL (контролне групе). Трансаминазе (Aspartate transaminase (AST) и Alanine transaminase (ALT)) из серума жртвованих животиња биће одређене применом Olympus китова за одређивање трансаминаза и коришћењем AU 400 Olympus chemistry analyzera.

**Хистолошка анализа:** Након жртвовања мишевима ће се извадити јетра и правиће се парафински исечци. Хематоксилином и еозином обојени препарати служиће за одређивање степена некрозе хепатоцита након интравенске примене Con A.

Квантитативна хистолошка анализа биће урађена применом Autodesk Autocad 2009 програма према публикованом протоколу.

**Изолација мононуклеарних ћелија из јетре:** Након жртвовања мишева, 8 сати након интравенског давања Con A (експерименталне групе), односно NaCL (контролне групе) изоловаће се мононуклеари из јетре према протоколу за изолацију интрахепатичних лимфоцита.

**Фенотипизација изолованих интрахепатичних лимфоцита:** Проточном цитометријом, коришћењем BD FACS Calibur-a, WINMDI програма и анти-мишјих антитела, одредиће се проценат и укупан број CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, CD19<sup>+</sup> В лимфоцита, NK1.1<sup>+</sup> (C57BL/6), NKp46<sup>+</sup> (BALB/c) NK ћелија, CD3<sup>+</sup>NK1.1 (C57BL/6), CD3<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> (BALB/c) NKT ћелија, F4/80<sup>+</sup> макрофага, CD11c<sup>+</sup> дендритичних ћелија у јетри експерименталних и контролних животиња.

Коришћењем анти-мишјих антитела за мерење интрацелуларних цитокина TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 и IL-10 а уз комбинацију са CD4+, CD3+NK1.1 (C57BL/6), CD3+NKp46+ (BALB/c), CD11c+ и F4/80+ одредићемо проценат и укупан број интрахепатичних TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 и IL-10 продујућих CD4+ Т лимфоцита, IFN- $\gamma$  и IL-4 продујућих NKT ћелија и IL-10 продукујућих дендритичних ћелија и макрофага.

**Одређивање серумског нивоа цитокина:** Одређиваћемо серумске нивое цитокина 8 сати након интравенског давања Con A (експерименталне групе), односно NaCl (контролне групе). Одредићемо серумски ниво TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 и IL-10 ELISA техником, коришћењем ELISA сетова специфичних за мишје цитокине (R&D Systems Minneapolis, MN), према упутствима произвођача.

**Имунохистохемија:** Обзиром да CD4+ Т лимфоцити имају кључну улогу у IL33/ST2 сигналном путу интрахепатично присуство CD4+ Т лимфоцита у јетри BALB/c и мишева који су примили IL33 и Con A ће се одредити и имунохистохемијом, применом анти-CD4 антитела.

**Одређивање проапоптотских и анти-апоптотских протеина:** Con A се везује за ендотелне ћелије и оштећује их, а из оштећених ћелија се ослобађа IL-33. Western blot техником ћемо испитати да ли примена IL-33 утиче на експресију проапоптотских (active caspase-3, BAX) и анти-апоптотских протеина (Bcl-2 and p-ERK) у Con A индукованом оштећењу јетре.

**Снага студије и одређивање величине узорка (групе):** Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима серумске концентрације AST, ALT, IFN gamma, TNF, IL-17, IL-4 и IL-10, односно процента интрахепатичних моноклеарних 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 (за серумски ниво IL-10, SD=0.1), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 50 за сваку од група. 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

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 користићемо 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

Обзиром да *ST2 knock-out* мишеви показују смањену активност Th2 ћелија, што помера равнотежу лимфоцитних субсетова у правцу Th1/Th17 ћелија, очекујемо да ће оштећење јетре, након интравенске примене Con A, бити израженије код *ST2 knock-out* мишева него код BALB/c „wild type” животиња и да ће бити праћено значајним скоком про-инфламаторних цитокина (TNF alpha, IFN gamma, IL-17) који имају кључну улогу у некрози хепатоцита у овом моделу болести. Познато је да се синтеза и секреција ових цитокина може супримирати активацијом IL-33/ST2 сигналног пута па очекујемо да ће интравенска примена IL-33 ублажити оштећење јетре, као и да ће масовна некроза хепатоцита бити уочена код *ST2 knock-out* мишева код којих је овај сигнални пут онемогућен.

Главне „ћелије мете“ у Con A хепатитису су синусоидалне ендотелне ћелије јетре и хепатоцити за које се везује и које оштећује Con A. Познато је да IL-33 има анти-апоптотско дејство па очекујемо да ће превентивна интравенска примена интерлеукина 33, апликованог 24 сата пре Con A, ублажити конканавалином A индуковано оштећење хепатоцита.

Галектин 3 има важну улогу у адхезији ћелија за ендотел, па очекујемо да ће код Gal-3 „knockout” мишева, услед делеције гена за галектин 3, број интрахепатичних лимфоцита бити значајно мањи што ће се, сматрамо, манифестовати мањим оштећењем јетре.

### 2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи мишеве генетски дефицијентне у експресији ST2 молекула, галектина-3 и коришћењем рекомбинатног IL-33, одређивањем трансминаза, хистолошком анализом препарата јетре, проточном цитометријом, ELISA-ом, имунохистохемијом и Western blot-ом биће испитана улога IL33/ST2 сигналног пута и галектина-3 у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса. Испитаћемо утицај IL33/ST2 сигналног пута и галектина-3 на фенотип и укупан број мононуклеарних ћелија које

инфилтрирају јетру, анализираћемо цитокински профил ових ћелија и одредити нивое серумских цитокина пре и након интравенске апликације Cop A.

## **2.10. Предлог ментора**

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **Проф. др Миодрага Лукића**, који је професор емеритус Медицинског факултета 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 Небојша Арсенијевић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
2. Проф. др Миодраг Лукић, члан, професор емеритус Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,
3. Проф. др Миодраг Чолић, члан, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија.

## **Закључак и предлог комисије**

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Владислав Воларевић, 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. Владислава Воларевића указати да постоје статистички значајни резултати и показатељи да IL33/ST2 сигнални пут и галектин-3 играју важну улогу патогенези експерименталног моделу фулминантног хепатитиса.
4. Комисија предлаже Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Владислава Воларевића, под називом **„IL33/ST2 сигнални пут и галектин 3 у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса"** и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

---

**2. Проф. др Миодраг Лукић**, члан, професор емеритус Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,

---

**3. Проф. др Миодраг Чолић**, члан, редовни професор Војномедицинске академије у Београду, за ужу научну област Имунологија.

---

У Крагујевцу, 24.01.2011 године