

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-03-385/26 од 15.05.2019. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Александар Ацовића, под називом:

**„Улога индоламин 2,3 диоксигеназе у имуномодулацији улцерозног колитиса:
параметри инфламације у усној дупљи и колону”**

Чланови комисије су:

1. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник;
2. проф. др Милош Дука, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална хирургија, члан;
3. доц. др Јелена Миловановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
4. доц. др Наташа Здравковић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;
5. НС Бојана Симовић-Марковић, научни сарадник Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат Александар Ацовић рођен је 26.09.1990. године у Крушевцу. Основну и средњу школу завршава у Крагујевцу. Интегрисане академске студије стоматологије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу завршава 2016. године и стиче звање доктора стоматологије. Након завршених студија обавља обавезни стаж у Заводу за стоматологију, Факултета медицинских наука у трајању од шест месеци. Докторске академске студије уписује 2016. године, изборно подручје Имунологија, инфекција, инфламација на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Од 2016. године у оквиру академског кружења обавља послове фацитатора, сарадника у настави, а касније и истраживача приправника за ужу научну област Ортопедија вилица.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Улога индоламин 2,3 диоксигеназе у имуномодулацији улцерозног колитиса: параметри инфламације у усној дупљи и колону

Предмет: Циљ овог истраживања је да се испита улога IDO-а у индукцији регенерације оштећене слузнице црева и праћење параметара инфламације мерењем кинуренина у усној дупљи.

Хипотеза: IDO подстиче регенерацију мукозе црева код пацијената оболелих од улцерозног колитиса.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису најмање категорије M51 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Acovic A, Gazdic M, Jovicic N, Harrell RC, Fellabaum C, Arsenijevic N, Volarevic V. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in pathology of the gastrointestinal tract. Therap Adv Gastroenterol. 2018;11:1756284818815334. **M21**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Улцерозни колитис је инфламацијска болест црева која се карактерише фазама егзацербације и ремисије. Због сличности у погледу молекулских механизма одговорних за настанак и прогресију, мишији колитис индукован декстран натријум сулфатом (DSS-колитис) је један од најчешће коришћених експерименталних модела за испитивање улцерозног колитиса. Аналогно улцерозном колитису људи, имунске ћелије (макрофаги, дендритске ћелије (DCs), неутрофили, Т лимфоцити) имају најважнију улогу у патогенези DSS-колитиса. Регулаторни Т лимфоцити (Tregs), продукцијом имуносупресивних цитокина, супримирају инфламацију и подстичу регенерацију оштећене слузнице црева. Постоји драматична разлика у току DSS-колитиса код мишева различитих сојева. Тако, BALBc мишеви развијају лакши облик болести са спонтаном регенерацијом слузокоже црева док C57BL/6 мишеви развијају тежу форму болести која прогредира у хроничитет. Показано је, у моделу DSS-колитиса, да давање триптофана поспешује регенерацију оштећене слузнице док искључивање триптофана из исхране узрокује егзацербацију болести. Уз то, подаци клиничких студија су потврдили да постоји негативна корелација између концентрације триптофана у серуму и прогресије улцерозног колитиса. У *lamina propria*-ји црева се триптофан метаболише кинуренинским путем, активношћу ензима индоламин 2,3 диоксигеназе (IDO). Највећа активност IDO-а је забележена у DCs и мезенхимским матичним ћелијама (MSCs) које се због својих имуномодулацијских карактеристика примењују у терапији инфламацијских болести, укључујући и улцерозни колитис. Ипак, и поред бројних студија које су анализирале имуномодулацију колитиса применом DCs и MSCs, још увек није познато да ли DCs и MSCs могу да индукују регенерацију оштећене слузнице црева механизмом који зависи од IDO-а.

Степен оштећења слузнице црева, па тако и развој болести, се најпоузданије утврђују колоноскопијом, али се ова инвазивна дијагностичка метода не може често изводити. Одређивање фекалног калпротектина представља најчешће коришћени алтернативни дијагностички параметар за праћење тока болести и успешности терапије. Ипак, недостатак валидираног *cut-off*-а и недовољна специфичност овог теста, указује на потребу за увођење нових неинвазивних дијагностичких метода којим се може процењивати успешност терапије и степен регенерације оболеле слузнице. Анализом концентрације имуномодулацијских фактора у гингивалној течности, серуму и фецесу могуће је пратити прогресију локалних и системских инфламацијских болести.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Главни циљ овог истраживања је да се испита улога IDO-а у индукцији регенерације оштећене слузнице црева.

У складу са основним циљем постављени су и конкретни експериментални задаци:

1. Испитати молекулске механизме којима IDO подстиче регенерацију мукозе црева код пацијената оболелих од улцерозног колитиса.
2. Испитати могућност одређивања концентрације кинуренина у серуму, фецесу, гингивалној течности као новог дијагностичког параметра за праћење регенерације слузнице црева код оболелих од улцерозног колитиса.
3. Испитати значај IDO-а и продукта његовог метаболизма, кинуренина у DCs и MSCs- посредованој модулацији DSS-колитиса C57BL/6 и BALBc мишева.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Давање триптофана, у моделу улцерозног колитиса изазваног применом декстран натријум сулфата (DSS-колитис), поспешује регенерацију оштећене слузнице, док искључивање триптофана из исхране узрокује егзацербацију болести. Показана је и негативна корелација између концентрације триптофана у серуму и прогресије улцерозног колитиса. Триптофан се, у ламини проприји црева, метаболише кинуренинским путем активношћу ензима индоламин 2,3 диоксигеназе (IDO). Највећа активност овог ензима забележена је у дендритским ћелијама (DCs) и мезенхимским матичним ћелијама (MSCs). С обзиром да није познато да ли DCs и MSCs могу да индукују регенерацију оштећене слузнице црева механизмом зависним од IDO-а, ова студија ће утврдити значај IDO-а и продукта његовог метаболизма- кинуренина у терапији улцерозног колитиса посредованој DCs и MSCs.

Степен оштећења слузнице црева се најпоузданије оцењује колоноскопијом, али се ова инвазивна дијагностичка метода не може често примењивати. Анализом концентрације имуномодулацијских фактора у гингивалној течности, серуму и фецесу могуће је пратити прогресију инфламацијских болести. Ова студија ће утврдити значај одређивања кинуренина у гингивалној течности, серуму и фецесу оболелих од улцерозног колитиса као потенцијално новог дијагностичког параметра за анализу степена регенерације оштећене слузнице црева и праћења тока болести.

Молекуларни механизми којима IDO индукује регенерацију црева биће анализирани индуковањем DSS-колитиса у C57BL/6 и BALB/c мишевима што је прихваћен модел прогресивног колитиса односно спонтане регенерације оболеле слузнице црева.

Релевантност добијених резултата биће потврђен анализом концентрација кинуренина у серуму, фецесу и гингивалној течности пацијента оболелих од улцерозног колитиса груписаних у две експерименталне групе: са спонтаном регенерацијом слузнице и са прогресивном болешћу. Концентрације кинуренина ће бити корелиране са клиничким и хистолошким скором као и фенотипом и функцијом имунских ћелија присутних у цревима оболелих пацијената.

2.7. Метод истраживања

2.7.1. Врста студије

- 1) Експериментална *in vivo* и *in vitro* студија на мишевима
- 2) Експериментална *ex vivo* студија на хуманом материјалу

Истраживање ће бити спроведено у Центру за молекуларску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука, универзитета у Крагујевцу, Заводу за стоматологију, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу и Центру за гастроентерологију и хепатологију, Интерне клинике, Клиничког центра Крагујевац.

2.7.2. Популација која се истражује

Предвиђено је да минимум 60 пацијената оболелих од улцерозног колитиса буде груписано у 2 експерименталне групе (пацијенти са спонтаном регенерацијом слузнице и они са прогресивном болешћу) на основу *Mayo* клиничког скорa, ендоскопског налаза и концентрације фекалног калпротектина.

2.7.3. Узорковање

Од испитаника биће узети серум, фецес и сулкусна течност, а од оболелих и биоптат црева. У свим узорцима ће се мерити концентрација кинуренина.

Укључујући критеријуми су:

- 1) Потписан добровољни пристанак за учешће у студији

2) *експериментална* група: Оболели од улцерозног колитиса чија је дијагноза верификована ендоскопским и патохистолошким налазом

3) *контролна група*: Здрави пацијенти

Искључујући критеријуми су:

1) Пацијенти млађи од 18 година, труднице, дојиље

2) Пацијенти са дијагностикованим колоректалним карциномом или Кроновом болешћу

3) Пацијенти са обољењем пародонцијума

Мерење цитокина, фекалног калпротектина, CRP-а и концентрација кинуренина у серуму и столицама пацијената са улцерозним колитисом

Концентрација инфламацијских цитокина одговорних за прогресију улцерозног колитиса (фактора некрозе тумора (енгл. *Tumor Necrosis Factor α* , TNF- α), *CXC motif chemokine 11* (CXCL-11) и Интерлеукина (IL)-17), имуносупресивног цитокина IL-10, фекалног калпротектина и C реактивног протеина (CRP-а) биће измерени ELISA комерцијалним китовима. Активност IDO-а ће бити одређивана спектрометријским мерењем кинуренина.

Мерење цитокина и концентрације кинуренина у гингивалној течности оболелих од улцерозног колитиса и здравих контрола

Од 30 оболелих од улцерозног колитиса и 15 здравих контрола биће узоркована сулкусна течност из гингивалног сулкуса осам зуба: по два предња и по два бочна зуба у горњој и доњој вилицы. Зуби који су претходно конзервативно збрињавани, или имају пародонталне џепове, видљиве знаке инфламације и сулкусе који су дубљи од 4 милиметра неће бити узети у обзир за узорковање сулкусне течности. Пре узорковања, биће уклоњене наслагe, зуби ће бити изоловани папирним поенима, посушени, а потом ће се у гингивални сулкус унети апсорпциони папир (*Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA*). Апсорпциони папир ће бити држан 30 секунди, након чега ће бити пребачен у епендорф тубу са 150 микролитара FBS-а (енгл. *Fetal Bovine Serum*). Апсорпциони папири који су контаминирани крвљу, конкрементима, пљувачком или наслагама ће бити одбацивани. Узорци ће затим бити вортексовани и центрифугирани 5 минута на 1500g и 4°C, а затим ће бити складиштени на -20°C до анализе.

Концентрација инфламацијских цитокина одговорних за прогресију колитиса (TNF- α , IL-23, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-12, CXCL-11, IL-17) и имуносупресивног IL-10 биће

измерени ELISA комерцијалним китовима. Активност IDO-а ће бити анализирана спектрометријским мерењем кинуренина.

Анализа фенотипа ћелија изолованих из ламине проприје ткива дебелог црева пацијената оболелих од улцерозног колитиса

Имунске ћелије ће се изоловати из биоптата колона пацијената са улцерозним колитисом. Материјал ће се опрати три пута у HBSS-у (енгл. *Hank's Balanced Salt Solution*). Након испирања, инкубираће се у HBSS-у са 1mM EDTA (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) током 10 минута на 37°C, уз благо мешање да би се издвојиле епителне ћелије. Након инкубирања ћелије ће се поново испрати у HBSS-у и инкубирати током 20-30 минута у 2ml RPMI медијуму са 1mg/ml колагеназом типа I (=336U/ml), 0.1mg/ml DNase-ом и 1mg/ml хијалоуонидазом без FCS (енгл. *Fetal Calf Serum*) на 37°C. Након инкубирања ћелије ће се двапут испрати PBS-ом (енгл. *Phosphate-Buffered Saline*) и финално ресуспендовати са *Ficoll* градијентом. Тако ресуспендоване ћелије ће се центрифугирати током 20 минута на 690g без кочења. Интерфаза ће се полако уклонити и испрати PBS-ом. На тај начин ће се добити ћелијска суспензија, која ће се користити за проточну цитометрију.

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских анти-хуманих антитела за бојење мембранских маркера (CD56, CD4; BD Pharmingen, USA), односно коришћењем примарно коњугованих моноклонских анти-хуманих антитела (IFN- γ , IL-17, IL-10, FoxP3; BD Pharmingen) за интрацелуларно бојење, претходно обележених различитим флуоресцентним бојама (*allophycocyanin, APC; fluorescein, FITC; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyl protein complex*), одредиће се присуство различитих популација имунских ћелија присутним у цревима оболелих пацијената. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије ће се инкубирати 4h на 37°C у присуству 5 μ g/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-a (PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA), 5 μ g/ml ionomycin-a (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) и 0.8 μ l Golgi plug (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након инкубације, ћелије ће се фиксирати и пермеабелизовати употребом BD Cytofix/Cytoperm kit-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележити одговарајућим анти-хуманим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима.

Експерименталне животиње

Експерименти ће се спровести на мишевима соја C57BL/6 и BALBc мишева, старости од 6-8 недеља, виваријума Војномедицинске академије који ће, након транспорта, бити

смештени у просторијама виваријума Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Индукција DSS-колитиса

DSS-колитис ће се изазвати 3% раствором DSS-а током пет дана, након чега би уследио период опоравка од 7 дана (само приступ пијаћој води). Клинички скор (енгл. *Disease Activity Index*, DAI) обухвата праћење губитка телесне масе, конзистенције столице и присуства/одсуства ректалног крварења током ексеримента.

Ћелијске линије мишијих MSCs и њихова апликација

У експериментима у којима ће се испитивати улога IDO-а и продукта његовог метаболизма, кинуренина у терапији улцерозног колитиса MSCs, користиће се комерцијалне линије мишијих мезенхималних матичних ћелија изолованих из костне срже C57BL/6 мишева (Gibco/Invitrogen, кат. број S1502-100) и костне сржи BALB/c мишева (Cell Biologics кат. број BALB-5043). Ћелије ће се узгајати у DMEM медијуму (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) који садржи са l-глутамин (200mM), неесенцијалне аминокиселине (10x), 1% penicillin/streptomycin (100x) и 10% FBS. Ћелије ће се инкубирати на 37°C у атмосфери 5% CO₂, а у складу са препорукама произвођача (Gibco/Invitrogen).

Током 2. и 5. дана експеримента, мишевима ће се интраперитонеално, апликовати 1x10⁶ MSCs ресуспендованих у 200µl 0.9% NaCl.

Припрема ткива дебелог црева и одређивање хистолошког скорa

Исечци ткива у парафинским калупима користиће се за хистолошки преглед бојењем хематоксилин-еозином. На хистолошким препаратима одређиваће се оштећење епитела и инфилтрација инфламацијским ћелијама према претходно описаном протоколу.

Изолација инфламацијских ћелија из *lamina propria*-е ткива дебелог црева

Након жртвовања мишева издвојиће се ткиво дебелог црева и изоловати ћелије из ламине проприје по већ утврђеном протоколу. Дебело црево се пресече лонгитудинално и додатно уситни на 3-4 секције, након тога се испира HBSS-ом који не садржи магнезијум и калцијум. Дигестија парчића дебелог црева се изводи у 20ml HBSS медијума са 10% FBS-ом, 15mM HEPES-ом, 5mM EDTA, 30 минута у воденом купатилу на 37°C. Након тога фрагменти црева се поново испирају са HBSS-ом и додатно што је више могуће уситњавају. Садржај се третира са 1ml 4000 Mandl јединица колагеназе D и 200µl 1mg/ml DNase, током једног сата на 37°C у воденом

купатилу. Добијени супернатант се филтрира кроз серију ћелијских сита различитог промера (100 μ m и 40 μ m) и центрифугира на 450g током 10 минута. Након одливања супернатанта, пелет се ресуспендује 30% Percoll-ом, а затим пажљиво, низ зидове епрувете се дода 70% Percoll. Целокупни садржај се центрифугира на 1100g током 20 минута. Мртве ћелије и дебрис ће се наталожити на дну епрувете, док ће површински слој чинити епителне ћелије. Мононуклеарне ћелије ће се издвојити између ова два слоја. Средњи слој ће бити ресуспендован у комплетном медијуму. На овај начин ће се добити суспензија имунских ћелија, која ће се користи за проточну цитометрију.

Анализа фенотипа ћелија изолованих из *lamina propria*-е ткива дебелог црева

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских анти-мишјих антитела за бојење мембранских маркера (CD3, CD4, CD25, CD11c, CD45; BD Pharmingen, USA) обележених различитим флуоресцентним бојама (*allophycocyanin, APC; fluorescein, FITC; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyl protein complex*) ће се одредити заступљеност популација имунских ћелија важних у патогенези експерименталног модела колитиса и то: CD45⁺ леукоцита, CD4⁺ Т лимфоцита, CD11c⁺ дендритских ћелија. Коришћењем примарно коњугованих моноклонских анти-мишјих анти-цитокинских антитела (IL-12, IL-1 β , IFN- γ , IL-17, FoxP3 и IL-10; BD Pharmingen) за интрацелуларно бојење одредиће се процентуални удео и укупан број различитих мембрански обележених ћелија које их продукују. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије ће се инкубирати 4h на 37°C у присуству 5 μ g/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-a (PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA), 5 μ g/ml ionomycin-a (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) и 0.8 μ l Golgi plug (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након инкубације, ћелије ће се фиксирати и пермеабелизовати употребом BD Cytotfix/Cytoperm kit-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележити одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима.

Мерење цитокина у серуму експерименталних животиња

Концентрација цитокина важних у патогенези хроничног колитиса (IL-1 β , IL-12, IL-10) ће се мерити у серуму мишева, 7 дана након примене DSS-а, ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Изолација DCs и њихов пасивни трансфер

У експериментима у којима ће се испитивати улогаIDO-а и продукта његовог метаболизма, кинуренина у DCs-посредованој терапији улцерозног колитиса, биће коришћене DCs изоловане из слезине мишева магнетном сепарацијом. Спленцити ће

се издвојити на следећи начин: слезина се хомогенизује клипом шприца и материјал пропусти кроз ћелијско сито (енгл. *cell strainer*, BD Pharmingen, USA) у епрувету уз додавање 5ml комплетног медијума. Овако добијена суспензија ћелија центрифугираће се на 250g током 5 минута, а онда ће се одлити супернатант. Присутни еритроцити лизираће се, током инкубације ткивног материјала, у 5ml раствора за лизирање у трајању од 5 минута на +4°C. После тога додаће се 5ml комплетног медијума да би се зауставило даље лизирање. Затим ће се ћелије центрифугирати, одлити супернатант и ћелије ресуспендовати у 1ml комплетног медијума. На тај начин ће се добити суспензија појединачних спленочита која ће се користити за даљу изолацију дендритских ћелија на колонама.

Издвајање дендритских ћелија на магнетним колонама обавља се у две фазе. Најпре се ћелије обележавају магнетним куглицама на следећи начин: пребројане ћелије (10^8 ћелија), центрифугираће се на 200g током 10 минута. Талог ће се ресуспендовати у 400µl пуфера (PBS pH 7.2, 0.5% BSA и 2mM EDTA). Додаће се 100µl магнетних куглица (енгл. *MicroBeads*) обележених са CD11c. Суспензија ће се добро измешати и инкубирати током 15 минута у фрижидеру (2–8°C). Након инкубације ћелије ће се опрати у 1–2ml пуфера и центрифугирати на 200g током 10 минута. Талог ће се ресуспендовати у 500µl пуфера. У другој фази обавиће се магнетно издвајање обележених ћелија (позитивна селекција). Колоне ће се поставити на MACS сепаратор (енгл. *Magnetic cell sorting*; Miltenyi Biotec, Немачка) и пошто се оперу са 3ml пуфера на њих ће се поставити ћелијска суспензија. Необележене ћелије које прођу кроз колоне ће се сакупити, а колоне ће се опрати још три пута са 3ml пуфера, а потом пренети са сепаратора на епрувете. Додаће се 5ml пуфера и снажним и брзим покретом притиснути клип колоне.

За адоптивни трансфер дендритских ћелија експериментални мишевима ће се интраперитонеално убризгати 200.000 DCs ресуспендованих у 200µl PBS-а, једнократно петог дана експеримента.

Деплеција Tregs

У циљу испитивања улога Tregs за модулацију DSS-колитиса посредовану DCs а зависну од IDO-а урадиће се деплеција ових ћелија у мишева третираних DSS-ом који ће након тога примити 200.000 DCs ресуспендованих у 200µl PBS-а, једнократно петог дана од иницијалне примене DSS-а. У циљу испитивања деплеције Tregs, мишевима ће се интраперитонеално апликовати циклофосфамид (CY; Galenika A.D., Belgrade, Serbia) у дози 10mg/kg, три дана пре индукције болести.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: улцерозни колитис људи и DSS-колитис C57BL/6 и BALB/c мишева

Зависне варијабле: кинуренин, фекални калпротектин, CRP, TNF- α , IL-23, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-12, CXCL-11, IL-17, IL-10, CD45+ леукоцити, CD4+ Т лимфоцити, CD11c+ дендритске ћелије присутне у *lamina propria*-ји црева

2.7.5. Снага студије

Величина узорка је утврђена на основу података о вредностима за концентрацију имуносупресивног цитокина IL-10 у серуму, фецесу и гингивалној течности, односно процента мононуклеарних ћелија које га продукују, публикованих у студијама сличног дизајна (15). 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 минималан потребан број пацијената односно експерименталних животиња према групама.

2.7.6. 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

Резултати који ће бити добијени у овом истраживању објасниће улогу и значај IDO-а за DCs и MSCs-посредован терапију улцерозног колитиса. Уз то, уколико резултати ове студије покажу корелацију између концентрације кинуренина у серуму, фецесу, гингивалној течности, са клиничким и хистолошким показатељима регенерације оболеле слuzнице, мерење активности кинуренина би могло да представља нов дијагностички приступ за утврђивање повољних ефеката терапије и индукцију

регенерације црева код оболелих од улцерозног колитиса као и параметар за праћење степена активности болести.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Резултати који ће бити добијени у овом истраживању објасниће улогу и значај IDO-а за DCs и MSCs-посредован терапију улцерозног колитиса. Уз то, уколико резултати ове студије покажу корелацију између концентрације кинуренина у серуму, фецесу, гингивалној течности, са клиничким и хистолошким показатељима регенерације оболеле слезнице, мерење активности кинуренина би могло да представља нов дијагностички приступ за утврђивање повољних ефеката терапије и индукцију регенерације црева код оболелих од улцерозног колитиса као и параметар за праћење степена активности болести.

3. Предлог ментора

Због мултидисциплинарности студије кометоре ове докторске дисертације предлажу се проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и доц. др Владимир Ристић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Ортопедија вилица. Предложени ментори испуњавају 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

1. 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;24(5):687-702.
2. Acovic A, Gazdic M, Jovicic N, Harrell RC, Fellabaum C, Arsenijevic N, **Volarevic V**. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in pathology of the gastrointestinal tract. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756284818815334
3. Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Randall Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, L Lukic M, Stojkovic M, **Volarevic V**. Intraperitoneal

- administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells. *Biomed Pharmacother* 2018; 100:426-432.
4. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, **Volarevic V**. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL- β in macrophages. *J Crohns Colitis* 2016;10(5):593-606.
 5. Simovic Markovic B, Nikolic, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic ML, **Volarevic V**. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. *Stem cell International* 2016; 2016: 2640746
 6. **Volarevic V**, Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors* 2017;43(5):633-644.

Радови доц. др Владимира Ристића

1. Nogo Živanović D, Kanjevac T, Bjelović Lj, **Ristić V**, Tanasković I. The effect of final irrigation with TAD, QMix, and EDTA on smear layer removal and mineral content of root canal dentin. *Microscopy Research and Technique* 2019; DOI: 10.1002/jemt.23239
2. Djordjevic G, Dagovic A, **Ristic V**, Kanjevac T, Brajkovic D, Popovic M. Trends and Patterns of Disparities in Oral Cavity and Pharyngeal Cancer in Serbia: Prevalence and Economic Consequences in a Transitional Country. *Front Pharmacol* 2017; 8:385. doi: 10.3389/fphar.2017.00385.
3. Jakovljevic M, Kanjevac T, Lazarevic M, **Ristic V**. Long term dental work force build-up and DMFT-12 improvement in the European region. *Frontiers in Physiology* 2016; 7(48). doi: 10.3389/fphys.2016.00048
4. **Ristić V**, Stefanović N, Stamenković Z, Živković Sandić M, Stojić V, Glišić B. Effects of Three Types of Functional Appliances in Class II Malocclusions Treatment – Sagittal and Vertical Changes. *Srp Arh Celok Lek.* 2018;146(3-4):149-156
5. Stamenkovic Z, Raičkovic V, **Ristic V**. Promene mekotkivnog profila primenom funkcionalnih aparata u lečenju skeletnih promena II klase. *Srp Arh Celok Lek* 2015; 143(1-2): 12-15.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција, инфламација

5. Научна област чланова комисије

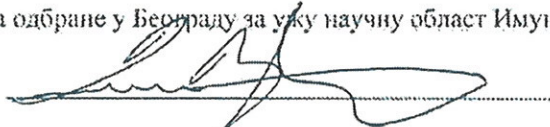
1. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник;
2. проф. др Милош Дука, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална хирургија, члан;
3. доц. др Јелена Миловановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
4. доц. др Наташа Здравковић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;
5. НС Бојана Симовић-Марковић, научни сарадник Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Закључак и предлог комисије

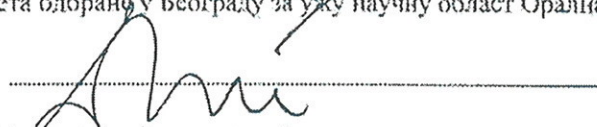
1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикованих радова др Александра Ацовића, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита улога ИДО-а у инаукцији регенерације оштећене слузнице црева и праћење параметара инфламације мерењем кинуренина у усној дупљи.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Александра Ацовића под називом „Улога индоламина 2,3 диоксигеназе у имуномодулацији улцерозног колитиса: параметри инфламације у усној дупљи и колону” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

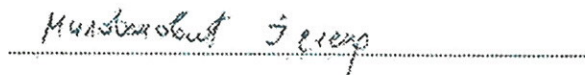
1. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник



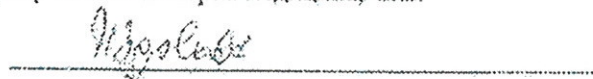
2. проф. др Милош Дука, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална хирургија, члан



3. доц. др Јелена Митовановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан



4. доц. др Наташа Здравковић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан



5. ИС Бојана Симоновић-Марковић, научни сарадник Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

