

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-8083/5-3 од 03. 11. 2010. године именована је комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под насловом: „Испитивање улоге и значаја STAT3 молекула и хуманих мезенхималних матичних ћелија у експерименталном моделу тумора дојке“ кандидата др Биљане Љујић, у следећем саставу:

1. Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика - председник комисије;

2. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области: Микробиологија и имунологија - члан;

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

На основу увида у приложену документацију комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др Биљана Љујић, испуњава све услове предвиђене Законом о Универзитету (члан 57) и Статутом Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу (члан 22) за израду докторске дисертације.

І Биографски подаци

а) Лични подаци

Др Биљана Т. Љујић рођена је 23.11.1974. године у Новој Вароши. Основну школу је завршила у Новој Вароши, а средњу Медицинску у Крагујевцу. Медицинску факултет у Крагујевцу, уписала је школске 1993/94. године, а дипломирала 18. јула 2005. године са просечном оценом 8,20 (осам двадесет) и тиме стекла звање доктора медицине. Обавила је општи лекарски стаж и положила стручни испит. Академске докторске студије-изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је школске 2005/06. године. Усмени докторски испит положила је 26.06.2007. године са оценом 10 (десет). 07. јуна 2007. године изабрана је за Асистента за предмет Хумана генетика на Медицинском факултету у Крагујевцу. Члан је Друштва имунолога Србије. Последипломско усавршавање „Реакција ланчаног умножавања са детекцијом продуката у реалном времену (REAL TIME PCR) – основни модул“ завршила 2009. године на Институту за имунологију, Медицинског факултета у Београд. Од 2008. године истраживач је на 3 јуниор пројекта Медицинског факултета у Крагујевцу.

б) Научно-истраживачки рад и списак објављених радова

Радови објављени у научним часописима од међународног значаја (М 20)

1. **Ljujic B**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Acimovic Lj, Knezevic M, Bankovic D, Zdravkovic D, Arsenijevic N. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. Archives of Medical Research 2010; 41(3): 182-189 (**М 23; 3 бода**)

2. 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 (**М 23; 3 бода**)

3. Kastratović T, Tanasković I, Lačković V, Šorak M, Stanković V, **Ljujić B**, Sedlar S and Živanović A. Mitotic activity of smooth muscle cells of the mioma: does hormonal stimulation have an effect on the number of mitosis? Archives of biological sciences.2010; 62(1): 39-45 (**M 23; 3 бода**)

Радови објављени у часописима од националног значаја (M 50)

1. **Ljujić B** i Stojkovic M. Methods for derivation of human embryonic stem cells. Ser J Exp Clin Res 11 (2010) 25-31 (**M 52; 2 бода**)

Саопштења са међународних скупова, штампана изводу (M 30)

1. Radosavljevic G, Jovanovic I, **Ljujić B**, Pajovic S, Zdravkovic N, Zivic D, Knezevic M, Arsenijevic N, Lukic M. Deletion of Galectin-3 in vivo downregulates lung specific metastasis of melanoma cells. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S728 (**M 34; 0.5 бодова**)

2. Jovanovic I, Radosavljevic G, **Ljujić B**, Pajovic S, Zdravkovic N, Knezevic M, Majstorovic I, Arsenijevic N, Colic M, Lukic M. Attenuation of primary breast tumor growth and lung metastasis in ST2 deficient mice. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S727 (**M 34; 0.5 бодова**)

3. Pajovic S, Zdravkovic N, Radosavljevic G, Jovanovic I, **Ljujić B**, Djukic A, Majstorovic I, Arsenijevic N, Colic M, Vassiliev C, Lukic M. Intravenous immunoglobulins attenuate diabetes induction in mice. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S671 (**M 34; 0.5 бодова**)

Квантификацијом објављених радова, према члану 181 Статута медицинског факултета у Крагујевцу, кандидат др Биљана Љујић је као аутор и коаутор радова објављених у међународним и домаћим часописима показао да се његов досадашњи научно-истраживачки рад може вредновати са **12.5 бодова** (према критеријумима Правилника о поступку и начину вредновања и квантитативном исказивању научноистраживачких резултата истраживача, "Сл. гласник РС", бр. 38/2008).

II Подаци о предложеној теми

Истраживања која су планирана за реализацију при изради ове тезе су из области Имунологије и инфламације.

а) Предмет рада

Туморска средина и начин на који туморске ћелије интерагују са ћелијама строме и ћелијама имунског система су значајне компоненте у разумевању биологије тумора. Преносилац сигнала и активатор транскрипције-3 (STAT3) је молекул који спроводи сигнале многобројних онкогених протеина и путева, такође је значајан активатор многих гена који су круцијални за имуносупресију. Скорија истраживања су показала да активирани STAT3 молекул има важну улогу у интеракцији између туморских и ћелија имунског система. Конститутивна активација STAT3 молекула је детектована у бројним туморима. Активирани STAT3 молекул повећава пролиферацију туморских ћелија, ангиогенезу, метастазирање и смањује имунски надзор. Осим тога, STAT3 има улогу у активацији имуносупресивних фактора као што су васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), интерлеукин 10 (IL-10) и интерлеукин 6 (IL-6) који инхибишу експресију имуностимулаторног молекула, интерлеукина 12 (IL-12).

Значајну улогу у туморогенези имају прогениторске ћелије строме, односно мезенхималне матичне ћелије (MSC). MSC су адултне матичне ћелије које поседују клонску мултипотентност. Скорија истраживања су показала да MSC поседују имуносупресивне ефекте и способност миграције, што их чини јако атрактивним у алогеној терапиској примени. Djouad et al. су 2003 год. показали да када се MSC ко-трансплантирају са ћелијама малигног меланома у мишевима се развија примарни тумор, исти резултат се добија и када се MSC трансплантирају у места која су удаљена од тумора. Међутим, исти тим истраживача је показао да присуство MSC омогућава ранији раст тумора али да нема утицаја на метастазирање, док су Karnoub et al. 2007 показали да када се MSC ко-трансплантирају заједно са малигним ћелијама повећавају метастатски потенцијал неколико ћелијских линија карцинома дојке. Осим тога, MSC секретују IL-6 који на паракрини начин повећава раст туморских ћелија дојке. Своје имуносупресивне ефекте

MSC могу испољити и директним контактом са малигним ћелијама. Овакав контакт обезбеђује активацију STAT3 молекула у малигним ћелијама.

Стога разумевање догађаја који активирају STAT3 молекула може обезбедити боље разумевање биологије тумора и сам процес туморигенезе.

б) Циљеви истраживања

1. Детекција трансплантираних хуманих MSC у туморском и плућном ткиву миша;
2. Имунохистохемијско одређивање експресије STAT3 молекула у туморском и плућном ткиву;
3. Испитивање утицаја ко-трансплантираних MSC на развој, раст и метастазирање тумора;
4. Испитивање улоге MSC и STAT3 молекула на продукцију Th1/Th2/Th17 цитокина у анималном моделу тумора;
5. In vitro испитивање утицаја MSC на степен цитотоксичности моноцита и лимфоцита изолованих из дренажућих лимфних чворова и слезине;
6. Одређивање броја и фенотипа лимфоцита изолованих из дренажућих лимфних чворова и слезине.

ц) Материјал и методе

- У експериментима ћемо користити две стандардизоване ћелијске линије:

1. 4T1 ћелијску линију: мишије туморске ћелије изоловане из примарног тумора женки мишева соја BALB/C. Ћелије се узгајају у медијуму: DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) обогаћеним са l-глутамином (200 mM), неесенцијалним аминокиселинама (10 x), 1% penicillin/streptomycin (100 x) и 10 % FBS (fetal bovine serum).

2. MSC ћелијску линију: хумане мезенхималне матичне ћелије из периферне крви. Ове ћелије се узгајају у DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) обогаћеним са l-глутамином (200 mM), неесенцијалним аминокиселинама (10 x), 1% penicillin/streptomycin (100 x) и 10 % FBS (fetal bovine serum).

Ћелије се инкубирају на 37 C° у атмосфери 5 % CO₂.

- Експерименталне животиње и индуковање тумора

Као експерименталне животиње користиће се мишеви сојева BALB/C, женке старости од 8 до 12 недеља. Тумори ће се индуковати апликацијом туморске 4T1 ћелијске линије и ко-трансплантацијом ове линије са MSC. Укупно 130 мишева, распоређених у пет контролних и четири експерименталне групе користиће се у експерименту:

1. Једну контролну групу ће сачињавати 10 мишева којима ће се субкутано у четврту млечну жлезду убризгати 2 x 10⁴ 4T1 ћелија ресуспендованих у 50 µl медијума.
2. Остале контролне групе (по 10 мишева) ће се субкутано у четврту млечну жлезду или интравенски у репну вену убризгати 2 x 10⁵; 4 x 10⁵ MSC ћелија ресуспендованих у 50 µl медијума односно 2 x 10⁵; 4 x 10⁵ MSC ћелија ресуспендованих у 100 µl медијума.
2. Прву експерименталну групу ће сачињавати 20 мишева којима ће се субкутано у четврту млечну жлезду убризгати 2 x 10⁴ 4T1 ресуспендованих у 50 µl медијума и интравенски (у репну вену) 2 x 10⁵ MSC ресуспендованих у 100 µl медијума.
3. Другу експерименталну групу ће сачињавати 20 мишева којима ће се субкутано у четврту млечну жлезду убризгати 2 x 10⁴ 4T1 ресуспендованих у 50 µl медијума и интравенски (у репну вену) 4 x 10⁵ MSC ресуспендованих у 100 µl медијума.
4. Трећу експерименталну групу ће сачињавати 20 мишева којима ће се субкутано у четврту млечну жлезду коинјектирати мешавина ћелија коју чине 2 x 10⁴ 4T1 и 2 x 10⁵ MSC у укупном волумену од 50 µl медијума.
5. Четврту експерименталну групу ће сачињавати 20 мишева којима ће се субкутано у четврту млечну жлезду коинјектирати мешавина ћелија коју чине 2 x 10⁴ 4T1 и 4 x 10⁵ MSC у укупном волумену од 50 µl медијума.

- Мерење величине примарног тумора

Величина примарног тумора одређиваће се морфометријски. Запремина тумора се израчунава по формули $V \text{ (mm}^3\text{)} = L \text{ (већи пречник) } \times W \text{ (мањи пречник}^2\text{)}/2$ (Carlsson et al., 1983).

- Верификација броја и величине метастатских колонија

Стандардним патохистолошким бојењем: ткивне исечке обојити хематоксилин-еозинским бојењем. Микроскопирањем ће се одређивати број и величина метастатских колонија.

- Детекција трансплантираних хуманих MSC

Присуство или одсуство гена специфичних за хумане ћелије биће одређивано мултиплексном реакцијом ланчане полимеризације тј. PCR-ом (PCR-multiplex polymerase chain reaction). Као допунска метода у детекцији хуманих MSC користиће се имунохистохемија, у којој ће бити коришћена моноклонска анти-хумана антитела (Mitochondrial Marker (SPM198): sc-56566).

- Имунохистохемијско одређивање експресије STAT3 молекула у туморском ткиву

Имунохистохемијском методом, користећи моноклонска ант-имишија антитела (p-STAT3 (Ser 727): sc-135649), одређиваће се експресија STAT3 молекула у туморском и плућном ткиву.

- Одређивање фенотипа леукоцита и интрацелуларне експресије цитокина

Проточном цитометријом, користећи моноклонска ант-имишија антитела (CD4, CD8, CD25, Foxp3, IL-4, IL-17 и IFN- γ), одређиваће се фенотип и интрацелуларна експресија цитокина у лимфоцитима изолованим из дренајућих лимфних чворова и слезине. Анализирање узорака ће се вршити на FACS-у (Becton-Dickinson, FACS-Calibur, Mountainview, CA, USA).

- Мерење нивоа цитокина у серуму

Мериће се серумски нивои цитокина (IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ) ELISA и ELISPOT техникама.

- Цитотоксичност моноцита и тумор специфичних лимфоцита

Након жртвовања мишева и изоловања дренажујућих лимфних чворова и слезине, узорци ткива ће се хомогенизовати кроз најлонско ћелијско сито. Тако добијени хомогенат ће се ресуспендовати у медијуму, центрифугирати и сипати у петри шоље које су претходно наливене говеђим серумом и инкубирати 60 минута (37 C°, 5 % CO₂). Након инкубације сакупиће се супернатант, чиме су уклоњени лимфоцити, док ће се гуменим скрапером механички одвојити моноцити адхерисани за петри шољу. Изоловане ћелије ће након процене вијабилности и броја, бити ресуспендоване у медијуму и инкубиране са МТТ штоком (5 mg/ml МТТ раствореним у PBS-у) 4 h на температури 37 C° у атмосфери 5 % CO₂. По отклањању супернатанта ћелијама се додаје 200 µl DMSO-а и инкубирају се 30 мин на радној температури након чега се оптичка густина чита на Zenit-у 595 nm.

ВРСТА СТУДИЈЕ

Експериментална студија

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Статистичка значајност одређиваће се за ниво $p=0.05$, тако да ако је $p<0,05$ вредности имају правилну расподелу и користиће се параметарски Т – тест, а ако је $p>0,05$ користиће се непараметарски Mann-Whitney-ев тест. У међусобном поређењу више од две експерименталне групе користи ће се ANOVA или Kruskal-Wallis тест. Mann-Whitney тест би се такође користио као алтернатива Che-Square тесту, јер у неким ситуацијама та алтернатива има већу снагу прихватања или одбацивања нулте хипотезе него процентуални (%) тест. За статистичку обраду добијених резултата користићемо комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 13). Добијени резултати биће приказани табеларно и графички.

ЗНАЧАЈ ИСТРАЖИВАЊА

Ово истраживање нам може дати нове податке о механизмима туморигенезе, стицања метастатског потенцијала, самог метастазирање, као и механизмима неспецифичног и специфичног имунског одговора на туморе. Улога STAT3 молекула и MSC у овим процесима је значајна и није у потпуности испитана. Своје имуносупресивне ефекте MSC могу испољити и директним контактом са малигним ћелијама. Овакав контакт обезбеђује активацију STAT3 молекула у малигним ћелијама, што за последицу може имати протуморске ефекте. Значај истраживања је вишеструк. Осим испитивања механизма туморигенезе, отвара се могућност примене ових сазнања у терапијске сврхе.

д) Очекивани резултати и значај истраживања:

Ово истраживање нам може дати нове податке о механизмима туморигенезе, стицања метастатског потенцијала, самог метастазирање, као и механизмима неспецифичног и специфичног имунског одговора на туморе. Улога STAT3 молекула и MSC у овим процесима је значајна и није у потпуности испитана. Своје имуносупресивне ефекте MSC могу испољити и директним контактом са малигним ћелијама. Овакав контакт обезбеђује активацију STAT3 молекула у малигним ћелијама, што за последицу може имати протуморске ефекте. Значај истраживања је вишеструк. Осим испитивања механизма туморигенезе, отвара се могућност примене ових сазнања у терапијске сврхе.

III Закључак и предлог Комисије

На основу података презентованих у тачкама I и II извештаја, Комисија доноси следећи:

ЗАКЉУЧАК

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата кандидат др Биљана Љујић испуњава све законске услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, реч је о оригиналном научном истраживању које има за циљ истражи улогу и значај STAT3 молекула и мезенхималних матичних ћелија у развоју тумора дојке.

3. Комисија сматра да ће докторска теза др Биљане Љујић, представљати темељну студију која ће показати значај STAT3 молекула и мезенхималних матичних ћелија у бољем разумевању биологије тумора и самог процеса туморигенезе.

4. Комисија са задовољством предлаже Изборном већу Медицинског Факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Биљане Љујић под називом **„Испитивање улоге и значаја STAT3 молекула и хуманих мезенхималних матичних ћелија у експерименталном моделу тумора дојке“**, одобри кандидату израду докторске дисертације и одлуку о одобрењу упути на даљи поступак Стручном већу Универзитета.

Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **Проф. др Миодрага Стојковића**, редовног професора Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика.

Чланови комисије:

1. Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну области Генетика - председник комисије

2. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну области Микробиологија и имунологија – члан

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

У Крагујевцу _____