

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Наставно-научног већа**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-11083/3-7 од 30.10.2013. год, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Душана Михајловића** под називом:

**„Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деканоничне киселине“**

На основу одлуке Наставно-научног већа, формирана је Комисија у саставу:

- 1. Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
- 2. Академик проф. др Миодраг Чолић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
- 3. Доц. др Иванка Зелен**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан

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

**ИЗВЕШТАЈ**

Кандидат **др мед. Душан Михајловић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

## **2.1. Кратка биографија кандидата**

Душан Михајловић је рођен у Крушевцу 30. априла 1983. године. У Брису је завршио основну и средњу школу са одличним успехом. На Медицинском факултету у Нишу дипломирао је 2010. године са просечном оценом 9,43 и тиме стекао звање доктора медицине. Општи лекарски стаж је обавио у Клиничком центру у Нишу, а стручни испит положио 2011. године. У току редовних студија учествовао је на више међународних и домаћих студентских конгреса. Докторске академске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина, подподручје Имунологија, инфламација и инфекција уписао је 2010. године, а усмени докторски испит положио је априла 2013. године са оценом 10. Од октобра 2010. године ангажован је као сарадник у настави на предмету Медицинска биохемија на Медицинском факултету Војномедицинске академије (ВМА), Универзитета одбране у Београду. Активно се бави научноистраживачким радом на Институту за медицинска истраживања ВМА. Сарадник је на пројекту ВМА под називом: „Регулаторни механизми у запаљенским и имунским реакцијама“ (МФВМА/4/12-14).

### **Подаци о објављеним радовима**

**Mihajlovic D**, Rajkovic I, Chinou I, Colic M. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Functional Foods* 2013;5:838-846. (М21-8 бодова)

## **2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације**

**Наслов:** „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деканоничне киселине“. Наслов докторске тезе је савремен и актуелан и одсликава главне циљеве истраживања.

**Предмет** овог истраживања је да се испита ефекат 10-хидрокси-2-деканоничне киселине (10-HDA) на имунски одговор хуманих ћелија *in vitro*, као и утицај ове масне киселине на оксидативни стрес у култури ћелија имунског система.

### **Хипотезе:**

- 1) 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на имунски одговор хуманих ћелија *in vitro* при чему у високим концентрацијама делује инхибиторно, а у мањим концентрацијама стимулаторно
- 2) 10-HDA у опсегу имunosупресивних концентрација смањује оксидативни стрес у ћелијама имунског система

### **2.3. Подобност кандидата**

Кандидат је објавио један рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

### **2.4. Преглед стања у подручју истраживања**

Матични млеч, кремаста супстанца коју стварају мандибуларне и хипофарингеалне жлезде пчела радилица (*Apis mellifera*), представља главну храну матице и њених ларви. Због свог благотворног дејства на људски организам матични млеч се вековима користи у традиционалној медицини. Свеж матични млеч се састоји од различитих супстанци као што су протеини, шећери, масти, минерали и поједини витамини. Стога, последњих деценија, расте интересовање међу истраживачима да открију како ове појединачне супстанце делују. Тако су имуномодулаторна, антиалергијска, антиоксидативна и хипогликемијска само неке од активности које се приписују протеинској компоненти. Поред протеинског, претпоставља се да и липидни део има сличне биолошке и фармаколошке ефекте, што је недовољно истраживано.

Липиде матичног млеча чине слободне масне киселине, воскови, стероиди, феноли и фосфолипиди. Слободне масне киселине су средњеланчане (8-12 C атома), а најзаступљенија и карактеристична само за матични млеч је транс-10-хидрокси-2-деcanoична киселина (енг. *trans-10-hydroxy-2-decenoic acid*, 10-HDA). Иако први научни радови о овој масној киселини датирају још од педесетих година прошлог века мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној улози.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

У пријављеној теми докторске тезе јасно су постављени следећи циљеви:

- 1) Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на пролиферацију мононуклеарних ћелија периферне крви (PBMNC) стимулираних фитохемаглутинином (PHA) и алогених CD4+ Т лимфоцита у кокултури са дендритским ћелијама моноцитног порекла (MoDC)
- 2) Испитати дозно-зависан ефекат 10-HDA на поларизацију Th имунског одговора (Th1, Th2, Th17, Т регулаторни) на моделу интеракције MoDC и CD4+ Т лимфоцита, као и PHA стимулираних PBMNC
- 3) Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на продукцију проинфламаторних цитокина у култури PBMNC стимулираних са PHA, као и гранулоцита периферне крви активираних фармаколошким агенсима: форбол-12-миристанат-13-ацетатом (PMA), зимозаном, N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), липополисахаридом (LPS)
- 4) Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на параметре оксидативног стреса у култури гранулоцита периферне крви стимулираних горе наведеним стимулусима

**Значај:** Уколико би се очекиване активности 10-HDA доказале, ово истраживање би могло бити основа за израду нових лековитих препарата, као и за проширење индикација постојећих лекова. Поред тога, научно би било поткрепљено вишевековно веровање у благотворно дејство матичног млека и његових компоненти. Такође, ако се 10-HDA не посматра само као компонента матичног млека већ и као средњеланчана масна киселина са 10 C атома, значај ове студије био би још већи будући да се веома мало зна о утицају средњеланчаних масних киселина на имунски систем људи.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашња истраживања углавном на моделима животињских ћелија су показала њено анти-инфламаторно својство. Две новије студије на мишјој макрофагној ћелијској линији (RAW264) су потврдиле да 10-HDA инхибира продукцију азот оксида, као и IL-6 и TNF- $\alpha$ . Yung и сарадници су показали да 10-HDA супримира продукцију матриксних металопроотеиназа 1 и 3 пореклом из фибробласта изолованих од пацијената са реуматоидним артритисом. Истраживања спроведена у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду су показала да водени екстракт матичног млека и 10-

HDA имају имуномодулаторна својства на ћелијама пацова, али механизми укључени у ове процесе нису довољно истражени.

## 2.7. Методе истраживања

### Материјал и методе

#### А) Врста студије

Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*

#### Б) Популација која се истражује

а) Хумане дендритске ћелије моноцитног порекла

б) Хумане моноклеарне ћелије периферне крви

в) Хумани неутрофили периферне крви

За култивацију ћелија биће коришћен комплетан медијум сачињен од основног (RPMI 1640 медијум) са додатком 10% феталног телећег серума (енгл. fetal calf serum, FCS; PAA Laboratories, Austria), 50 $\mu$ M 2-меркаптоетанола (2-ME), 50 i.u./ml пеницилина и 50mg/ml стрептомицина (Галеника, Београд).

#### В) Метод

##### Изолација и култивација ћелија

PBMNC ће бити изоловане из леукоцитног концентрата (енгл. buffy coat) центрифугирањем (2200 rpm, 20 минута на собној температури) на Limforgrer градијенту (PAA Laboratories; густине 1.077g/ml). Леукоцитни концентрат добијен од крви добровољних давалаца ће обезбедити Институт за трансфузиологију Војномедицинске академије. Овако добијене ћелије ће бити коришћене за изолацију моноцита и Т лимфоцита, али и за постављање културе.

##### Изолација моноцита

Моноцити ће бити изоловани из PBMNC на основу њихове способности да адхерирају на површину пластичних фласкова. Биће засејано  $30 \times 10^6$  ћелија/фласку у 5ml комплетног медијума. Након двочасовне инкубације на 37°C, у атмосфери засићеној воденом паром са

5% CO<sub>2</sub>, неадхерентна фракција ћелија биће одстрањена испирањем са PBS-ом (phosphate buffered saline), а адхерентна (моноцитна) фракција даље култивисана према потребама експеримента.

#### Добијање и култивација МоDC

Моноцити добијени на описан начин биће култивисани 6 дана у пластичним флашковима на 37°C, у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO<sub>2</sub> у комплетном медијуму уз додатак GM-CSF (100 ng/ml) (rh GM-CSF; Leucotax, специфичне активности 4.44x10<sup>6</sup> IU) –(Sandoz-Schering Plough, Switzerland) и IL-4 (20 ng/ml) (rh IL-4, Roche Diagnostics GmbH, Germany). По истеку шестог дана култивације, незреле МоDC биће сакупљене и стимулисане LPS-ом у одсуству или присуству различитих концентрација 10-HDA. Након 48 сати инкубације, ћелије ће бити сакупљене и даље коришћене у фенотипским и функционалним тестовима. Супернатанти из свих базена у којима су ћелије култивисане биће сакупљени и смрзнути на -20°C у циљу каснијег одређивања нивоа цитокина.

#### Изолација алогених CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита помоћу имуномагнетног сортирања

За поставку културе мешане леукоцитне реакције (енгл. mixed leukocyte reaction, MLR) и одређивање способности МоDC за поларизацију имунског одговора Th лимфоцита биће коришћени CD4<sup>+</sup>Т лимфоцити изоловани методом имуномагнетног сортирања из PBMNC помоћу комерцијалног кита за изолацију, а према протоколу произвођача (CD4<sup>+</sup>T-cell Isolation Kit, MACS technology, Miltenyi Biotec, Germany). Према овом протоколу CD4<sup>+</sup> ћелије ће проћи кроз колону (налазиће се у негативној фракцији). Чистоћа изолованих CD4<sup>+</sup> ћелија биће проверена помоћу проточне цитофлуориметрије применом анти-CD4 антитела коњугована флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC, fluorescein isothiocyanate) (Serotec, Oxford, UK).

#### Изолација неутрофила

Неутрофили периферне крви ће бити изоловани из крви добровољних давалаца којој је као антикоагуланс додат K<sub>3</sub>EDTA. Након седиментације ћелија са 5% раствором декстрана 30-45 мин издвојиће се плазма обогаћена леукоцитима. Таква плазма биће пажљиво нанета на површину Limforger градијента, а након центрифугирања (2200 rpm, 20 минута на собној

температури) еритроцити ће бити лизирани помоћу лизинг пуфера. На крају ће ћелије бити ресуспендоване у HBSS пуферу (Hank's balanced salt solution). Чистоћа ћелијске суспензије биће одређивана бојењем цитоспин препарата техником May-Grunwald-Giemsa, а вијабилност ћелија утврђена бројањем ћелија у 0.2% раствору Трипан плавог. Овако добијени неутрофили биће коришћени према потребама експеримента.

#### Морфолошка анализа ћелија

##### Припрема цитоспин препарата

Ћелије, ресуспендоване у медијуму са 2% FCS-ом ( $1,5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ ) ће бити нанете на микроскопске плочице претходно премазане поли-L-лизином (PLL) помоћу цитоспин центрифуге (MPW-35, Poland).

##### May-Grünwald Giemsa бојење

Цитоспин препарати биће преливени May-Grünwald бојом (Merck KGaA, Germany) и инкубирани 5 минута. По истеку инкубације, препарати ће бити испрани дестилованом водом и потом третирани наредних 20 минута Giemsa-ом (разблажења 1:10 у дестилованој води)(Merck KGaA, Немачка). На крају, након испирања у дестилованој води, препарати ће бити осушени на собној температури и посматрани под светлосним микроскопом OLYMPUS CX31 (Olympus, Japan).

#### Мерење апоптозе

##### Türk бојење

Апоптоза ћелија биће одређивана морфолошким анализом свежих ћелија обојених раствором Тирка (Türk) ( $2 \times 10^5$  ћелија у  $50 \mu\text{l}$  медијума +  $100 \mu\text{l}$  Тирка (15)). На мултиспот плочицу биће нането  $10 \mu\text{l}$  ћелијске суспензије, а затим покривено покровним стакалцем. Узорци ће бити анализирани на светлосном микроскопу (OLYMPUS CX31) бројањем најмање 500 ћелија по препарату.

##### Мерење апоптозе коришћењем пропидијум јодида

Ћелије ће након култивације бити сакупљене, а потом ће им бити додат пропидијум јодид (PI) ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) (Sigma). Овако припремљене ћелије биће анализирани на проточном

цитофлуориметру (EPICS XL-MCL, Coulter, Krefeld, Germany). Ћелије обојене PI неће се сматрати живим. Вијабилност ћелија биће одређивана по формули  $100\% - \% PI+$  ћелија. Апоптоза ће бити анализирана на проточном цитофлуориметру, након додавања PI (10  $\mu\text{g/ml}$ ) који је растворен у хипотонном цитратном/Triton-X раствору и четворосатне инкубације у мраку.

#### Фенотипска анализа ћелија

Степен матурације и активације MoDC биће одређиван на основу исказивања карактеристичних површинских молекула. За ову методу биће коришћена мишја моноклонска антитела (mAb) (доле побројана) која су специфична за хумане антигене и коњугована флуоресцентним бојама (FITC и фикоеритрин (PE, phycoerythrin)).

Моноклонска антитела коришћена у фенотипској анализи MoDC:

анти-CD40 (FITC)	BD Biosciences, USA
анти-CD54 (PE)	Serotec, UK
анти-CD80 (FITC)	Serotec, UK
анти-CD83 (FITC)	BD Biosciences, USA
анти-CD86 (PE)	Serotec, UK
анти-HLA-DR (PE)	Serotec, UK
анти-CCR7 (FITC)	R&D Systems, USA
анти-CD1a (PE)	Serotec, UK

Ћелије, претходно испране и ресуспендоване у хладном PBS1 (PBS + 0,01%  $\text{NaN}_3$ ) ће са mAb бити инкубиране 30 минута на  $+4^\circ\text{C}$ , а затим фиксиране у 4% формалину. Као контролни узорци биће коришћена ирелевантна анти-мишја mAb коњугована FITC-ом или PE.

Овако обележене ћелије биће анализирани на проточном цитофлуориметру. Детаљна обрада података биће урађена помоћу програма FlowJo (Tree Star Inc., SAD). Резултати ће бити приказани у облику средњих вредности интензитета флуоресценце (енгл. mean fluorescence intensity, MFI). Биће анализирано најмање 5000 ћелија по узорку.

## Процена функционалних карактеристика ћелија

### Алостимулаторна способност МоDC

Алостимулаторна способност третираних МоDC биће одређивана према степену пролиферације алогених CD4+T лимфоцита у ко-култури са МоDC. У плочу од 96 места (Sarstedt, Germany) биће додате МоDC (stimulatori) у двоструко опадајућим концентрацијама ( $1 \times 10^4$ - $0.125 \times 10^4$  по базену) и CD4+T лимфоцити (респондери) у константној концентрацији од  $1 \times 10^5$ . Култивација ћелија ће трајати 5 дана у комплетном медијуму на  $+37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Током последњих 18 сати култивације ћелијама ће бити додат [ $^3\text{H}$ ]-тимидин (Amersham International, United Kingdom). Након 5 дана, ћелије ће бити покупљене аутоматским скидачем култура (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, USA), а уградња [ $^3\text{H}$ ]-тимидина биће мерена помоћу сцинтилационог бета бројача (LKB-1219 Rackbeta, Finland). Вредности ће бити изражене као број откуцаја у минути (енгл. Counts Per Minute, cpm).

### Тест пролиферације PBMNC

PBMNC ( $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ ) биће култивисане у одсуству или присуству различитих концентрација 10-NDA. За стимулацију пролиферације биће коришћен РНА (30  $\mu\text{g/ml}$ ) (Serva)). Културе ће бити инкубиране током 72h, а последњих 18 сати култивације ћелијама ће бити додат [ $^3\text{H}$ ]-тимидин. Ћелије ће бити покупљене аутоматским скидачем култура, а уградња [ $^3\text{H}$ ]-тимидина биће мерена помоћу сцинтилационог бета бројача. Вредности ће бити изражене као број откуцаја у минути.

### Мерење метаболичке активности неутрофила МТТ тестом

Ћелије ( $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ ) ће бити преинкубиране са различитим концентрацијама 10-NDA 30 минута, а затим ће бити стимулисане различитим стимулусима (PMA (16nM) (Sigma); zymosan (10 $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma); fMLP(10 $\mu\text{M}$ ) (Sigma); LPS (100ng/ml) (Sigma)) у току 12 сати. Након инкубације у ћелијске културе биће додат МТТ (3-4,5-dimethylthiazol 1-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) у финалној концентрацији од 0.5 mg/ml. Ћелије ће се затим инкубирати наредних 4 сата на  $37^\circ\text{C}$ , а реакција ће бити заустављена додавањем 1% раствора HCl-SDS. Интензитет растворене боје који је пропорционалан броју вијабилних ћелија и њиховој метаболичкој активности биће мерен помоћу спектрофотометра (LKB

Programmable microplate reader MODEL 5060-006, NT Laboratory, Italy) на таласној дужини од 570 nm (референтна 650 nm).

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила методом хемилуминисценције помоћу луминола

Ћелије ( $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ ) ће после тридесетоминутне пре-инкубације са растућим концентрацијама 10-HDA и луминолом ( $50\mu\text{M}$  (Serva, Germany)) бити стимулисане различитим стимулусима (PMA ( $16\text{nM}$ ); zymosan ( $10\mu\text{g/ml}$ ); fMLP ( $10\mu\text{M}$ ); LPS ( $100\text{ng/ml}$ )). Одмах након стимулације помоћу хемилуминисцентног спектрометра (Synergy HT, BIO-ТЕК) почеће мерење интензитета емитоване светлости који је пропорционалан синтетисаним слободним кисеоничним радикалима.

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила флуориметријски помоћу дихидрородамина

Ћелијама ( $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ ) ће после тридесетоминутне пре-инкубације са растућим концентрацијама 10-HDA бити додати дихидрородамин (енгл. dihydrohodamine 123, DHR) ( $10\mu\text{M}$ ) и различити стимулуси (PMA ( $16\text{nM}$ ); zymosan ( $10\mu\text{g/ml}$ ); fMLP ( $10\mu\text{M}$ ); LPS ( $100\text{ng/ml}$ )). Одмах након стимулације помоћу флуориметријског спектрометра (Synergy HT, BIO-ТЕК) почеће мерење интензитета емитоване светлости (ексцитација на  $485\text{nm}$ , а емисија на  $528\text{nm}$ ), који је пропорционалан синтетисаним слободним кисеоничним радикалима.

Мерење интензитета оксидативног праска неутрофила колориметријски помоћу NBT теста

Ћелије ( $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ ) ће бити инкубиране 12 сати са растућим концентрацијама 10-HDA у присуству или одсуству различитих стимулуса (PMA ( $16\text{nM}$ ); zymosan ( $10\mu\text{g/ml}$ ); fMLP ( $10\mu\text{M}$ ); LPS ( $100\text{ng/ml}$ )). Након инкубације у ћелијске културе биће додат NBT (nitrobluetetrazolium) у финалној концентрацији од  $0.5 \text{ mg/ml}$ . Ћелије ће затим бити инкубиране наредних 60 минута у термостату на  $37^\circ\text{C}$ . У току инкубације доћи ће до редукције жуто обојеног NBT-а у дифорамазан. Реакција редукције NBT-а биће заустављена раствором 1% HCl-SDS. Интезитет боје, директно сразмеран активности NADPH оксидазе, биће мерен на спектрофотометру на таласној дужини од  $570 \text{ nm}$  (референтна  $650 \text{ nm}$ ).

Одређивање концентрације малондиалдехида спектрофотометријски

Концентрација малондиалдехида (MDA), секундарног продукта липидне пероксидације, ће бити одређивана у супернатантима дванаесточасовних култура неутрофила са различитим концентрацијама 10-HDA и различитим стимулусима (PMA (16nM); zymosan (10µg/ml); fMLP (10µM); LPS (100ng/ml)). Супернатанти ће бити инкубирани са TBA реагенсом (15% трихлорсирћетна киселина и 0,375% тиобарбитурна киселина (TBA)) у воденом купатилу на 95°C 5 минута. После центрифугирања апсорбанца супернатаната, која је сразмерна концентрацији MDA, биће мерана на спектрофотометру на таласној дужини од 540 nm (референтна 650 nm). Концентрација MDA ће бити одређена помоћу стандардне криве.

Одређивање концентрације глутатиона спектрофотометријски

Садржај глутатиона ће бити одређиван колориметријски у депротеинисаном лизату неутрофила, претходно инкубираних са различитим концентрацијама 10-HDA и различитим стимулусима (PMA (16nM); zymosan (10µg/ml); fMLP (10µM); LPS (100ng/ml)), помоћу Елмановог реагенса који је 5,5-дитиобис-2-нитробензоева киселина (DTNB). Апсорбанца, сразмерна концентрацији глутатиона, биће мерана на спектрофотометру на таласној дужини од 410 nm. Концентрација глутатиона ће бити одређена помоћу стандардне криве.

NO Тест (по Gris-y)

Концентрација азот-оксида (NO) у супернатантима култура неутрофила биће мерена помоћу Griess-ове реакције. У супернатанте ће бити додат Griess-ов реагенс, а након 10 минута биће мерен интензитет растворене боје, који је сразмеран концентрацији нитрита, на спектрофотометру на таласној дужини од 570 nm (референтна 650 nm). Концентрација NO биће прерачуната коришћењем стандардне криве.

Одређивање продукованих цитокина

Концентрације свих доле наведених цитокина биће одређиване употребом комерцијалних ELISA китова према упутствима произвођача.

Утицај 10-HDA на функцију MoDC ће бити процењен на основу продукције цитокина у супернатантима култура MoDC третираних различитим концентрацијама 10-HDA са LPS-ом

(Sigma) (1  $\mu\text{g/ml}$ ) као стимулусом у трајању од 48 сати. Биће одређиване концентрације IL-12p70, IL-18, IL-10 и TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Способност MoDC у усмеравању Т ћелијског имунског одговора ће бити одређиван мерењем концентрација карактеристичних цитокина из супернатаната ко-културе MoDC и алогених CD4+Т лимфоцита (IL-2, IL-10 (R&D Systems), IL-4 (Invitrogen Biosource, Carlsbad, USA), IFN- $\gamma$  (Bender Med Systems, Vienna, Austria).

Утицај 10-HDA на функцију PBMNC биће процењен на основу продукције цитокина у супернатантима двадесетчетворочасовним култура ових ћелија са различитим концентрацијама 10-HDA и РНА (30  $\mu\text{g/ml}$ ) као стимулусом. Биће одређиване концентрације IFN- $\gamma$  ((Bender Med Systems, Vienna, Austria), IL-2, IL-5, IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  ((R&D Systems, Minneapolis, USA).

Утицај 10-HDA на способност неутрофила да секретују проинфламаторне цитокине биће одређен на основу мерења концентрације проинфламаторних цитокина TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, USA) у супернатантима дванаесточасовних култура неутрофила са различитим концентрацијама 10-HDA и различитим стимулусима (PMA (16nM); зимозан (10 $\mu\text{g/ml}$ ); fMLP (10 $\mu\text{M}$ ); LPS (100ng/ml)).

#### Г) Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле студије представљају различите концентрације 10-HDA (10 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 250 $\mu\text{M}$ , 500 $\mu\text{M}$ , 1mM, 2mM)

Зависне варијабле: вијабилност, степен апоптозе и матурације, као и продукција цитокина хуманих дендритских ћелија моноцитног порекла; пролиферација и продукција цитокина хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви; степен апоптозе, метаболичка активност, интензитет оксидативног праска и продукција цитокина хуманих неутрофила периферне крви

#### Д) Снага студије и величина узорка

Величина узорка је одређена на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 80%, вероватноће грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0.05 за Student's t тест (два независна узорка), поређећи групе међу собом (у оба смера), користећи програм G\*Power3. Према овим параметрима израчуната је укупна величина узорка (total sample size) која износи 102.

Ђ) Статистичка обрада података

Најпре ће бити испитана правилност расподеле добијених вредности. Уколико вредности буду имале правилну расподелу биће коришћен параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати ће бити приказани као средња вредност (mean) ± стандардна девијација (SD). Вредности добијених података биће сматране статистички значајним уколико је  $p < 0.05$ . Статистичка обрада података биће урађена помоћу статистичких програма GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., SAD) и SPSS 18 (IBM® SPSS® software, SAD).

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

Очекује се да ће 10-HDA испољити дозно-зависан ефекат на имунски одговор хуманих ћелија *in vitro*, при чему ће у високим концентрацијама деловати инхибиторно, а у мањим концентрацијама стимулаторно. Поред тога, очекује се да ће ова јединствена и најзаступљенија масна киселина матичног млека, примењена у опсегу имуносупресивних концентрација смањити ниво оксидативног стреса у култури неутрофила периферне крви стимулираних PMA, зимозаном, fMLP-ом или LPS-ом.

## **2.9. Оквирни садржај дисертације**

Будући да 10-HDA представља јединствену средњеланчану масну киселину, у природи пронеђену једино у матичном млеку, претпоставља се да је за већину благотворних ефеката матичног млека на имунски систем добрим делом одговорна ова масна киселина. Стога, планираним истраживањем биће испитан ефекат 10-HDA на имунски одговор и пролиферацију појединих хуманих ћелија имунског система *in vitro*, као и постојање разлика између примењених концентрација. Поред тога, биће испитан и утицај ове масне киселине на оксидативни стрес у култури гранулоцита периферне крви.

## **2.10. Име ментора**

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже академика Миодрага Чолића, редовног професора Медицинског факултета Војномедицинске академија, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија.

## **2.11. Научна област дисертације**

Медицина. Уже области биохемија и имунологија

## **2.12. Научна област чланова комисије**

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

**2. Академик проф. др Миодраг Чолић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

**3. Доц. др Иванка Зелен**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Душана Михајловића под називом: „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деканоничне киселине“ и одобри њену израду.

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

---

**2. Академик проф. др Миодраг Чолић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

---

**3. Доц. др Иванка Зелен**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан

---

У Крагујевцу, 26.12.2013. године