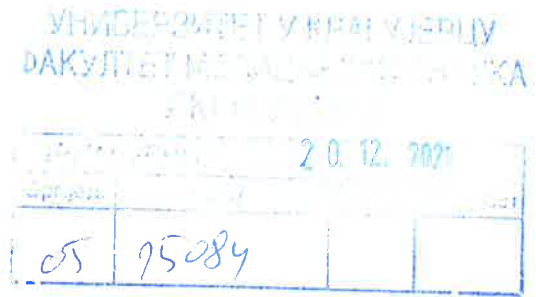


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-773/19 од 13.10.2021. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Јелене Димитријевић под називом:

„Утицај осовине PL-33/ST2 на развој неуроинфламације и неуродегенерације изазване системском применом липополисахарида“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Проф. др Гордана Радосављевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
4. **Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
5. **Проф. др Милица Боровчанин**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, члан

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1.Кратка биографија кандидата

Јелена М. Димитријевић рођена је 11.09.1991. године у Пожаревцу где је завршила основну школу и Пожаревачку гимназију, природно-математички смер, са одличним успехом. Интегрисане академске студије медицине на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2010/2011 године, где је и дипломирала 05.07.2016. године са просечном оценом 9,59 (девет и 59/100) и стекла звање доктора медицине. Током студирања била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја.

Од маја 2017. до октобра 2017. била је запослена у здравственој служби Казнено-поправног завода за жене у Пожаревцу. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација уписала је школске 2017/2018, а усмени докторски испит положила је 18.12.2019. са оценом 10 (десет).

Од децембра 2017. године била је ангажована у својству фацилитатора за ужу научну област Медицинска статистика и информатика и учествовала у извођењу практичне наставе. Изабрана је у звање сарадника у настави за ужу научну област Медицинска статистика и информатика на Факултету медицинских наука у Крагујевцу 14.01.2019. У децембру 2020. године изабрана је у звање асистента за ужу научну област Медицинска статистика и информатика.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Утицај осовине IL-33/ST2 на развој неуроинфламације и неуродегенерације изазване системском применом липополисахарида“

Предмет: Испитивање улоге осовине IL-33/ST2 на развој неуроинфламације и последичне неуродегенерације након системске примене липополисахарида и то коришћењем BALB/c WT и BALB/c ST2^{-/-} мишева.

Хипотезе: IL-33 има протективни ефекат у експерименталном моделу неуроинфламације и неуроинфламације изазване системском применом липополисахарида.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат Јелена Димитријевић је објавила рад у целини у часопису категорије **M51** у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Dimitrijevic J, Arsenijevic A, Milovanovic M, Stojanovic B, Arsenijevic D, Milovanovic J, Arsenijevic N. Role of IL-33/ST2 Axis in Chronic Inflammatory Neurological Disorders. *Ser J Exp Clin Res.* 2020; doi:10.2478/sjecr-2020-0038 **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Алцхајмерова болест спада у један од најчешћих облика деменције коју карактерише екстрацелуларно таложење амилоида β у ЦНС-у и формирање сенилних плакова. Когнитивни и бихевиорални поремећаји су у корелацији са акумулацијом β амилоида који индукује смрт неурона и разарање синапси. Иако је раније опште прихваћено становиште било да је инфламација у Алцхајмеровој болести секундарна, тј. реакција на оштећење неурона, бројне студије су показале да перзистентна системска инфламација индукује и развој инфламације у ЦНС-у и може да подстакне формирање депозита β амилоида, али и да појачава патолошки процес тј. да стимулише даље таложење амилоида и да подстакне формирање интрацелуларних неурофибриларних петљи. Резултати студија на животињама показују да су продужена неуроинфламација и активација микроглије изазвани интраперитонеалном применом LPS-а довољни да

индукују формирање депозита β амилоида у ЦНС-у мишева и когнитивне поремећаје, па је важно проучавање молекула са могућом улогом у редукцији неуроинфламације која доприноси одржавању неуродегенеративних промена.

Интерлеукин-33 (IL-33) је цитокин који припада IL-1 фамилији цитокина, продукују га различити типови ћелија, стромалне, епителне, ендотелне и неке од ћелија урођене имуности, док рецептор за IL-33, ST2, експримирају углавном ћелије имунског система: Т и В лимфоцити, макрофаги, дендритске ћелије, микроглија. IL-33, који у ЦНС-у у одговору на оштећење неурона продукују олигодендроцити и астроцити, стимулацијом ST2 рецептора активира микроглију и стимулише фагоцитозу. Активација IL-33/ST2 сигналног пута има бројне, често супротне улоге у развоју инфламацијских болести.

Код особа са Алцхајмеровом болешћу и умереним когнитивним поремећајима показана је мања експресија IL-33 у мозгу и већа концентрација солубилног ST2 који може да антагонизује ефекте IL-33 и полиморфизам гена за IL-33 и ST2, што указује да поремећај осовине IL-33/ST2 може да игра улогу у развоју ове болести. Показано је да IL-33 дефицијентни мишеви са старењем развијају таупатије и когнитивне поремећаје због значајно већег губитка неурона у кортексу и хипокампусу. Такође, третирање APP/PS1 мишева, који спонтано таложе амилоид у мозгу и развијају когнитивне поремећаје, интерлеукином-33 за резултат има појачану фагоцитну активност микроглије и смањење количине солубилног амилоида β . Такође IL-33 код ових мишева усмерава поларизацију макрофага/микроглије у антиинфламацијски фенотип и редукује експресију гена који кодирају проинфламацијске молекуле IL-1 β , IL-6 и NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*). IL-33 стимулише инфлуке неутрофила у ЦНС и промовише инфламацију у моделу неуроинфламације изазване интрацеребровентрикуларном применом LPS-а. Познато је да системска инфламација може да игра кључну улогу у иницијацији и промоцији неуродегенерације и индукцији когнитивних поремећаја код старијих особа.

2.5. Значај и циљ студије

Значај студије

Утицај IL-33 на развој неуроинфламације изазване системском применом LPS-а и последично таложење β амилоида до сада нису испитани. Овим испитивањем бисмо расветлили улогу осовине IL-33/ST2 у развоју инфламације која за последицу има развој неуродегенеративних промена.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај осовине IL-33/ST2 на развој неуроинфламације и последичне неуродегенерације изазване системском применом LPS-а и то коришћењем BALB/c WT и BALB/c ST2^{-/-} мишева.

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

1. Испитивањем експресије проинфламацијских и антиинфламацијских медијатора у ткиву ЦНС-а утврдити утицај IL-33/ST2 осовине на тежину неуроинфламације изазване системском применом LPS-а.
2. Испитати утицај осовине IL-33/ST2 на експресију молекула $A\beta_{1-42}$ у хипокампусу мишева после системске примене LPS-а.
3. Анализом процента апоптотичних и пролиферишућих неурона у хипокампусу и кортексу утврдити утицај IL-33/ST2 осовине на развој неуродегенерације после системске примене LPS-а.
4. Анализом морфолошких карактеристика Iba1 позитивних ћелија и експресије фосфорилисане форме NF- κ B испитати утицај осовине IL-33/ST2 на активацију и функционалне карактеристике микроглије после системске примене LPS-а.

2.6. Веза са досадашњим истраживањима

Иако је познато да IL-33 стимулише инфлуке неутрофила у ЦНС и промовише инфламацију у моделу неуроинфламације изазване интрацеребровентрикуларном применом LPS-а, тренутно нема података о утицају IL-33 на развој неуроинфламације изазване интраперитонеалном применом LPS-а и на последично таложење β амилоида. Познато је да системска инфламација може да игра кључну улогу у иницијацији и промоцији неуродегенерације и индукцији когнитивних поремећаја код старијих особа, па је анимални модел болести планиран у овом истраживању веома сличан имунопатогенетским механизмима који се сматрају одговорним за развој Алцхајмерове болести.

Планираним истраживањем би се детаљније испитала улога осовине IL-33/ST2 у развоју неуроинфламације изазване системском применом LPS-а и у последичном формирању β амилоидних плакова и то коришћењем ST2^{-/-} мишева и мишева третираних IL-33.

2.7. Материјал и метод

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија *in vivo* и на материјалу анималног порекла *in vitro* као и *ex vivo* на ћелијама изолованим из експерименталних животиња.

2.7.2. Популација која се истражује

Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја BALB/c старости 10 до 12 недеља, мушког пола и то (енгл. *Wild Type*, WT) и мишеви са делецијом гена за ST2 (енгл. *Knock-Out*, ST2^{-/-}). Све животиње би се одгајале под стандардним условима у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уз приступ води и храни *ad libitum*. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број 01-8667 од 17.07.2019.)

2.7.3. Узорковање

Мишеви ће бити подељени у следеће групе:

1. BALB/c WT мишеви који интраперитонеално примају LPS
2. BALB/c WT мишеви који интраперитонеално примају LPS и IL-33
3. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који интраперитонеално примају LPS
4. BALB/c WT мишеви који интраперитонеално примају физиолошки раствор
5. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који интраперитонеално примају физиолошки раствор
6. BALB/c WT мишеви који интраперитонеално примају IL-33

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: интраперитонеална примена LPS-а и IL-33.

Зависне варијабле: експресија IL-33 и ST2 у различитим ћелијама ЦНС-а, проценат активираних и инфламацијских микроглије, експресија β 1-42, концентрације цитокина, проценат апоптотичних ћелија у ЦНС-у, ниво експресије за каспазу 3, cMyc, P53, NLRP3, IL-1 β , IL-6, IL-33, TNF- α , Iba1, TLR4.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је на основу података о вредностима запремине примарног тумора у студији сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа (α) од 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), упоређујући групе између себепрема статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима (процент CD11b ћелија у ЦНС-у) између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 15 за сваку од група. Овакав узорак студије претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тест) између две групе животиња, са снагом студије $\geq 80\%$.

2.7.6. Статистичка обрада података

Добијени резултати биће представљени као средње вредности \pm стандардне девијације. Статистичка значајност ће се одређивати Student's t тестом и ANOVA тестом за узорке који имају нормалну расподелу и Mann-Whitney и Kruskal-Wallis тестом за узорке који немају нормалну расподелу. Статистичка значајност биће претпостављена за $p=0.05$. Све статистичке анализе биће обављене употребом програма SPSS верзија 20.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да IL-33 има протективни ефекат у експерименталном моделу неуроинфламације изазване системском применом LPS-а, да смањује активацију микроглије, продукцију инфламацијских цитокина, губитак неурона и депоновање амилоида бета. Такође се очекује да одсуство IL-33/ST2 осовине код ST2^{-/-} мишева има супротан ефекат, да након системске примене LPS-а ови мишеви развију јачу неуроинфламацију и депозите β амилоида.

Ово очекивање засновано је да претпоставци да IL-33 утиче на профил цитокина који се продукују у току развоја системског инфламацијског одговора и да подстиче диференцијацију M2 макрофага и регулаторних Т лимфоцита и тако смањује инфламацију, депоновање амилоида β и последичну неуродегенерацију.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Перзистентна системска инфламација индукује развој инфламације и у ЦНС-у и може да подстакне формирање депозита β амилоида и интрацелуларних неурофибриларних петљи, кључних патохистолошких одлика Алцхајмерове болести. Интерлеукин-33(IL-33) је члан IL-1 фамилије цитокина који се везује за ST2 молекул који експримирају ћелије имунског система, а активација IL-33/ST2 сигналног пута има бројне, често супротне улоге у развоју инфламацијских болести. IL-33 у ЦНС-у, у одговору на различита оштећења, у највећој мери продукују олигодендроцити и астроцити. Смањена експресија IL-33 у мозгу оболелих од Алцхајмерове болести и полиморфизам гена за IL-33 код оболелих, указују да поремећај осовине IL-33/ST2 може да игра улогу у развоју ове болести. IL-33 дефицијентни мишеви са старењем губе већи број неурона у поређењу са IL-33 позитивним мишевима што је праћено развојем когнитивних поремећаја, а мишевима који спонтано таложу амилоид у мозгу се након третмана интерлеукином-33 смањују количине солубилног амилоида β што је резултат појачане фагоцитне активности микроглије.

Имајући у виду да IL-33 утиче на функције ћелија имунског система и да на различите начине може да модулише ток инфламације, планирано истраживање има за циљ да испита улоге IL-33 у развоју неуроинфламације и формирању амилоидних плакова, процесима који се код мишева развијају након седмодневне системске примене липополисахарида (LPS, од енгл. *Lipopolysaccharide*).

Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја BALB/c старости 10 до 12 недеља, мушког пола и то (енгл. *Wild Type*, WT) и мишеви са делецијом гена за ST2 (енгл. *Knock-Out*, ST2^{-/-}). Мишеви ће примати LPS интраперитонеално 7 дана за редом, а једна група *wild type* мишева ће примати и IL-33. Анализираће се експресија проинфламацијских и антиинфламацијских цитокина у ЦНС-у (ниво протеина и ниво иРНК) и функционални статус микроглије имунохистохемијском методом и проточном цитометријом. Имунохистохемијском методом ће се анализирати утицај IL-33 на таложeње β амилоида, а TUNEL методом губитак неурона. Очекује се да IL-33 има протективни ефекат у експерименталном моделу неуроинфламације изазване системском применом LPS-а, да смањује активацију микроглије, продукцију инфламацијских цитокина, губитак неурона и депоновање амилоида бета, а да одсуство функционалне осовине IL-33/ST2 има супротни ефекат. IL-33 смањује продукцију инфламацијских цитокина у ћелијама микроглије које су активирани системском применом липолисахарида, а појачава њихову фагоцитну способност што резултује смањеним таложeњем β амилоида.

3. Предлог ментора

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже Проф. др Марију Миловановић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Предложени наставник испуњава 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 Марије Миловановић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Milovanovic M**, Volarevic V, Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N and Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. Plos ONE; 2012;7(9):e45225.
2. Jiang HR, **Milovanović M**, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Linington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. Eur J Immunol. 2012; 42(7):1804-14.
3. **Milovanovic M**, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. Immunol Res. 2012;52(1-2):89-99.
4. Volarevic V, Mitrovic M, **Milovanovic M**, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. J Hepatol. 2012;56(1):26-33.
5. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, **Milovanovic MZ**, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. Int J Cancer 2014; 134(7):1669-82.
6. Milovanovic J, Popovic B, **Milovanovic M**, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. Front Immunol. 2017;8:192.
7. Jevtovic A, Pantic J, Jovanovic I, **Milovanovic M**, Stanojevic I, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Radosavljevic GD. Interleukin-33 pretreatment promotes metastatic growth of murine melanoma by reducing the cytotoxic capacity of CD8+ T cells and enhancing regulatory T cells. Cancer Immunol Immunother. 2020;69(8):1461-1475.
8. Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Kanjevac T, Arsenijevic D, Radosavljevic G, **Milovanovic M**, Arsenijevic N. Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. Front Immunol. 2020;11:947.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Имунологија, инфекција и инфламација.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Проф. др Гордана Радосављевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
4. **Проф. др Иван Јовановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
5. **Проф. др Милица Боровчанин**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, члан

Закључак и предлог комисије

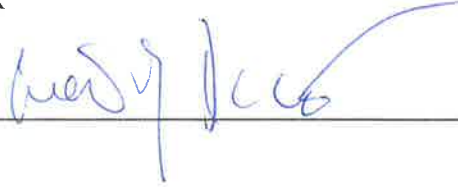
На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикацију др Јелене Димитријевић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

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 утврди улогу осовине IL-33/ST2 на развој неуроинфламације и последичне неуродегенерације након системске примене липополисахарида и то коришћењем BALB/c WT и BALB/c ST2^{-/-} мишева.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Јелене Димитријевић под називом **„Утицај осовине IL-33/ST2 на развој неуроинфламације и неуродегенерације изазване системском применом липополисахарида“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник



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



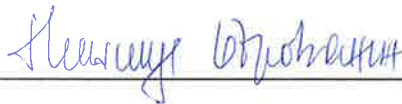
Проф. др Гордана Радосављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан



Проф. др Иван Јовановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан



Проф. др Милица Боровчанин, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, члан



У Крагујевцу, _____ 2021. године