

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

1. Одлука наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-3924/3-2 од 16.04.2014. год, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др стом. Милене Величковић** под називом:

“ **УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У ПАТОГЕНЕЗИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ПЕРИАПЕКСНИХ ЛЕЗИЈА**“

На основу одлуке Научно-наставног 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. **Проф. др Драгиња Којовић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, члан
3. **Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
4. **Доц. др Татјана Кањевац**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, члан
5. **Доц. др Владислав Воларевић**, доцент 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 Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др стом. Милена Величковић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

1.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

Милена (Драгиша) Величковић, доктор стоматологије, рођена је 7. фебруара 1985. године у Прокупљу. Медицински факултет у Нишу, студијску групу - стоматологија, уписала је школске 2004/2005. године, а дипломирала 1. јуна 2010. године са просечном оценом 9,74. Обавила је обавезни лекарски стаж и положила стручни испит. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина – подподручје: Имунологија, инфламација и инфекција, уписала јешколске 2010/2011. године, а усмени докторски испит положила је 31.10.2012. године са оценом 10. Школске 2008/2009. године вршила је функцију демонстратора на предмету Болести зуба - претклиника.

Б. Научно-истраживачки рад

Кандидат, др стом. Милена Величковић, активно се бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја од 2011. године ангажована је на пројекту под називом:

1. ОР 175071 „Утицај IL-33/ST2 сигналног пута и галектина-3 у патогенези експерименталних периапикалних промена“

Поред тога, учесник је Макро-пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

1. МП 01/12 „Имунопатологија инфламаторних, аутоимунских и малигних обољења: целуларни и молекуларни аспекти“

Кроз истраживачке програме Медицинског факултета у Крагујевцу 2012. године прошла је обуку категорије В (надлежна лица – истраживачи) у трајању од 80 часова, и на тај начин је оспособљена за рад са експерименталним животињама.

В. Подаци о објављеним радовима

В1. Радови објављени у часописима међународног значаја (Категорија М20)

1.1. Jankovic I, Kovacevic P, Visnjic M, Jankovic D, **Velickovic M**. A unique case of hereditary bilateral segmental neurofibromatosis on the face. *An Bras Dermatol* 2012; 87(3): 459-462. **М23=3 бода**

В2. Зборници међународних скупова (Категорија М30)

2.1. **Velickovic M**, Pejnovic N, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. The effect of ST2 deletion on the formation of the experimentally-induced periapical lesions in mice. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society - BaSS. Belgrade, Serbia, 24th – 27th April 2014. Abstract book: 214. **М34=0.5 бодова**

2.2. Lukic A, **Velickovic M**, Jeftic I, Kanjevac T, Mitrovic S. IL-33/ST2 signaling in human periapical lesions. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society - BaSS. Belgrade, Serbia, 24th – 27th April 2014. Abstract book: 214. **M34=0.5 бодова**

2.3. Jankovic I, Kovacevic P, Visnjic M, **Velickovic M**, Kovacevic T, Jankovic D. Prognostic significance of sentinel lymph nodes status for high risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. 5th European Conference of Head and Neck Oncology. Poznan, Poland, 18th - 21st April 2012. Abstract book: 1379. **M34=0.5 бодова**

B3. Часописи националног значаја (Категорија M50)

3.1. **Veličković M**, Mitrović S, Kanjevac T, Radosavljević G, Pavlović S, Lukić A. Gradacioni kriterijumi eksperimentalnih periapexnih lezija kod miševa. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2013; 14(2): 71-76. **M52=1.5 бодова**

3.2. Manić S, Milošević B, **Veličković M**. Nivo glikemije i težina neurološkog deficita kod pacijenata sa akutnim ishemijskim moždanim udarom. Timočki medicinski glasnik 2012; 37(3): 145-149. **M53=1 бод**

B4. Зборници скупова националног значаја (Категорија M60)

4.1. **Veličković M**, Stanje zdravlja prvog stalnog molara kod sedmogodišnjaka u Nišu. 50. kongres studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem. Lepenski Vir, Srbija, 30. april – 4. maj 2009. Abstract book: 14. **M64=0.2 бода**

1.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

“ Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија “

Предмет:

Периапексне лезије представљају локалну инфламаторну реакцију на анаеробну инфекцију канала корена зуба. Нумеричка и функционална равнотежа између Th1/Th17 (енгл. T helper cells, Th) и Th2/регулаторних Т лимфоцита (енгл. regulatory T cells, Tregs) у периапексним инфламаторним инфилтратима одређује обим деструкције периапексне алвеоларне кости. Док Th1/Th17 имунски одговор стимулише периапексну инфламаторну деструкцију, Th2 лимфоцити и Tregs одговорни су за процес репарације у апексном периодонцијуму. Недавно је показано да IL-33/ST2 сигнални пут значајно утиче на настанак и природу запаљенских процеса у различитим моделима болести. Како његова улога у патогенези периапексних лезија још увек није испитивана, сматрамо да је важно показати да ли делеција гена за ST2 молекула и апликација IL-33 имају утицаја на патогенезу и ток експериментално изазваних периапексних гранулома.

Као експерименталне животиње користићемо мишеве чистог соја BALB/c (енгл. wild type, WT) и мишеве истог соја са циљаном делецијом гена за ST2 (енгл. knockout, ST2^{-/-} BALB/c), мушког пола, старости 6-8 недеља. Периапексне лезије ћемо индуковати излагањем отворених пулпи мандибуларних молара микрофлори усне дупље. Део експерименталних BALB/c мишева ће у прве две недеље након индукције лезија примити четири дозе рекомбинантног IL-33. Мишеве ћемо жртвовати 14.-ог и 28.-ог дана експеримента. Након изолације хеми-мандибула, верификоваћемо хистолошке промене, испитати експресију IL-33 и ST2 молекула у периапексном ткиву и анализирати популације моноклеарних ћелија у периапексним лезијама и дренажу лимфним чворовима.

Очекујемо да ће делеција гена за ST2 молекула повећати инфлукс моноклеарних ћелија у периапексни регион BALB/c мишева након индукције лезија и подстакнути CD4⁺ лимфоците да продукују проинфламаторне цитокине, што ће узроковати значајно тежу деструкцију периапексне алвеоларне кости. Насупрот томе, очекујемо да ће примену рекомбинантног IL-33 након индукције гранулома смањити инфлукс моноклеарних ћелија у периапекс и супримирати CD4⁺ лимфоците да продукују проинфламаторне цитокине код BALB/c мишева. Очекујемо и да ће експресија IL-33 и ST2 молекула бити значајно повишена у индукованом периапексном гранулому у односу на здрави перидонтални лигамент BALB/c мишева.

Хипотезе:

IL-33/ST2 сигнални пут модулира имунски одговор и утиче на развој и сам ток експерименталних периапексних лезија. Атенуација овог сигналног пута доводи до веће експанзије периапексних лезија.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат, др стом. Милена Величковић, положила је усмени докторски испит 31.10.2012. године са оценом 10 (десет). Објавила је раду часопису категорије M52 који се објављује на једном од водећих светских језика, у коме је она први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Периапексне лезије представљају локалну инфламаторну реакцију на анаеробну инфекцију канала корена зуба, која најчешће настаје као последица несанираног каријеса, фрактуре зуба, трауматских оперативних денталних процедура, као и усред дејства јатрогених и других фактора који омогућавају продор микроорганизама у комору пулпе. Инфламаторни процесу периапексу започиње регрутацијом неутрофилних гранулоцита, а затим и ћелија које презентују антиген (енгл. antigen-presenting cells, APC), макрофага и дендритских ћелија, на место инфекције. У случају пролонгираног присуства иритације (бактерија и њихових продуката) процес поприма хронични ток и периапексни регион инфилтрише све већи број лимфоцита. Резултати имунохистохемијских студија показују доминацију Т лимфоцита у односу на В лимфоците. Однос CD4⁺ и CD8⁺Т лимфоцита мења се током развоја хроничне инфламацијске лезије. У раним фазама развоја денталних гранулома CD4⁺ лимфоцити бројно премашују CD8⁺ лимфоците. Ћелије које

презентују антиген, а посебно дендритске ћелије су од суштинске важности за поларизацију CD4⁺ лимфоцита у правцу Th1, Th17, Th2 или Tregs. Нумеричка и функционална равнотежа између Th1/Th17 и Th2/Tregs у периапексним инфламаторним инфилтратима одређује обим деструкције периапексне алвеоларне кости. Док Th1/Th17 имунски одговор стимулише периапексну инфламаторну деструкцију, Th2 лимфоцити Tregs одговорни су за процес репарације у апексном периодонцијуму.

Интерлеукин-33 (IL-33) је нови члан IL-1 фамилије цитокина. Први пут је описан као нуклеарни фактор у венулама високог ендотела лимфног ткива који је повезан са хроматином и регулише транскрипцију, тако да истовремено делује и као цитокин и као нуклеарни фактор. Главни извор IL-33 су ендотелне, епителне и ретикуларне фибробластне ћелије. Како се у екстрацелуларни простор ослобађа из некротичних ћелија, може да има улогу „алармина“ који обавештава имунски систем да постоји деструкција ткива. Недавно је показано да је IL-33 специфичан лиганд за ST2 рецептор (ST2L). ST2L налази се на површини Th2 лимфоцита, макрофага, NK, NKT ћелија, мастоцита, базофилних и еозинофилних гранулоцита. Интеракцијом са хетеродимерним рецепторским комплексом састављеним од ST2L молекула и помоћног протеина IL-1R (енгл. IL-1R accessory protein, IL-1RAcP), IL-33 активира транскрипциони фактор NF-κB (енгл. nuclear factor-κB) и MAP киназе (енгл. mitogen-activated protein kinases), и на тај начин индукује продукцију Th2 цитокина. Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експериментално изазваних периапексних гранулома још увек није позната.

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

Главни циљ истраживања

Испитати улогу IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

- Испитати утицај одсуства гена за ST2 молекула обим периапексне деструкције одређивањем површина периапексних лезија хистоморфометријским методама;
- Испитати утицај одсуства гена за ST2 молекула интензитет периапексне инфламације одређивањем броја различитих инфламаторних ћелија (неутрофилних гранулоцита, макрофага и лимфоцита) по mm² периапексних лезија ST2^{-/-} и BALB/c мишева;
- Одредити процентуалну заступљеност апсолутни број CD3⁺ лимфоцита, CXCR3⁺CD3⁺ и CCR6⁺CD3⁺ лимфоцита, CD4⁺, CD8⁺ лимфоцита, CD4⁺Foxp3⁺ регулаторних Т лимфоцита, CD49b⁺ NK ћелија, CD49b⁺CD3⁺NKT ћелија, F4/80⁺ макрофага, CD11c⁺ дендритских ћелија, CD11b⁺ мијелоидних ћелија и CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија у цервикалним лимфним чворовима, пре и после индукције обољења, и у периапексним лезијама ST2^{-/-} и BALB/c мишева;
- Одредити процентуалну заступљеност и апсолутни број CD4⁺Т лимфоцита који продукују TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-17, IL-4 и IL-5, и на тај начин испитати

функционални статус ових ћелија, како у цервикалним лимфним чворовима, пре и после индукције обољења, такои у самим периапексним лезијама ST2^{-/-} и BALB/c мишева;

- Испитати утицај примене рекомбинантног IL-33 на патогенезу индукованог периапексног гранулома код BALB/c мишева;
- Испитати експресију IL-33 и ST2 молекула у здравом периодонталном лигаменту и индукованом периапексном гранулому BALB/c мишева.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашње студије показале су да IL-33/ST2 сигнални пут може имати протективну или проинфламаторну улогу у патогенези различитих болести у зависности од доминантног имунског одговора који је у основи ових обољења. Протективна улога овог сигналног пута показана је у инфламаторним болестима које се развијају кроз Th1/Th17 имунски одговор - експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису, фулминантном хепатитису и дијабетесу мелитусу типа 1. Улога IL-33/ST2 сигналног пута у мишем моделу периапексних инфламаторних лезија није проучавана. Верујемо да ће IL-33/ST2 сигнални пут супресијом развоја Th1/Th17 имунског одговора у индукованом периапексном гранулому остварити протективну улогу у патогенези овог патолошког процеса.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње:

Као експерименталне животиње користиће се ST2^{-/-} и BALB/c мишеви, мушког пола, старости 6 до 8 недеља, телесне тежине 15-20g. ST2^{-/-} мишеви добијени су љубазношћу проф. др Мекензија (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom), док су BALB/c мишеви уступљени са Института за медицинска истраживања Војномедицинске Академије (ВМА) у Београду. Животиње се узгајају под стандардним условима у виваријумима Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уз приступ води и храни ad libitum. Пре укључења животиња у студију обезбедиће се одобрење надлежног Етичког комитета.

Експерименталне групе

E1: 35 BALB/c мишева којима ће пулпе мандибуларних молара бити изложене микрофлори усне дупље 14 дана након индукције лезија

E2: 35 BALB/c мишева којима ће пулпе мандибуларних молара бити изложене микрофлори усне дупље 14 дана након индукције лезија и којима ће интраперитонеално бити убризган рекомбинантни IL-33 трећег, шестог, девог и дванаестог дана експеримента

E3: 35 BALB/c мишева којима ће пулпе мандибуларних молара бити изложене микрофлори усне дупље 28 дана након индукције лезија

E4: 35 ST2^{-/-} мишева на BALB/c подлози којима ће пулпе мандибуларних молара бити изложене микрофлори усне дупље 14 дана након индукције лезија

E5: 35 ST2^{-/-} мишева на BALB/c подлози којима ће пулпе мандибуларних молара бити изложене микрофлори усне дупље 28 дана након индукције лезија

Контролне групе

K1: 35 здравих BALB/c мишева са интактним зубима

K2: 35 здравих ST2^{-/-} мишева на BALB/c подлози са интактним зубима

Укупан број животиња потребних за реализацију истраживања: 245

Индукција периапексних лезија:

Нултог дана експеримента мишеве ћемо увести у општу анестезију интраперитонеалним убризгавањем следеће комбинације анестетика: кетаминхидрохлорида (енгл. ketaminhydrochlorid; Richter Pharma AG, Wels, Austria) у дози 60 mg/kg телесне тежине и ксилазина (енгл. xylazine; Lloyd Inc, USA) у дози 10 mg/kg телесне тежине. Након анестезирања, мишеве ћемо фиксирати на постољу за интервенције и отворити пулпу мандибуларног првог и другог молара користећи технички микромотор (W&H Dentalwer, Birmoos, Austria) са 1/4-ским округлим денталним карбидним сврдлом. Величина експозиције зуба биће пропорционална дијаметру радног дела сврдла. Да је канал отворен проверићемо Кер иглом величине 8. Отворене пулпе биће изложене микрофлори усне дупље. Са циљем убрзавања настанка лезија мишеви ће добијати перорално 10%-ни раствор глукозе (Zorka Pharma, Šabac, Serbia) прве две недеље након индукције лезија у периоду од 15-9h.

Апликација IL-33:

Групи WT мишева на BALB/c подлози, изабраној насумичним избором, након индукције лезија убризгаћемо интраперитонеално рекомбинантни IL-33 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 1 µg/инјекцији) у четири термина: трећег, шестог, деветог и дванаестог дана експеримента.

Хистолошка анализа:

Мишеве ћемо жртвовати у атмосфери засићеној диетилетром 14.-ог и 28.-ог дана експеримента. Након изолације мандибула, маказицама ћемо уклонити околно меко ткиво и направити пресек између доњих централних секутића, тако да се добију хемимандибуле. Лево хемимандибулу фиксираћемо у 4% формалдехид 24h. Затим ћемо ткиво испрати текућом водом, потопити у декалцинат (3% мравља киселина) и оставити 24h у циљу деминерализације кости. Након 24h извадићемо ткиво из декалцината, испрати текућом водом и калупити у парафину. Лонгитудинални исечци, дебљине 4 µm, добијаће се коришћењем микротоме. Сваки четврти пресек бојићемо хематоксилин-еозином (H&E). Пресеци који обухватају круницу и дистални корен мандибуларног првог молара и пролазе кроз апикални форамен биће изабрани за хистоморфометријску анализу периапексних лезија.

Хистоморфометријска анализа периапексних лезија:

Препарате ћемо посматрати светлосним микроскопом (Carl Zeiss, Axioscop 40, USA) на увећању 100x и фотографисати дигиталним апаратом (Canon PC 1089, USA) водећи рачуна да обухватимо предео првог мандибуларног молара. Површину разграђене алвеоларне кости у периапексном региону одредићемо помоћу софтвера Image J 1.36 (National Institutes of Health, USA). Интензитет периапексног инфламаторног инфилтратата одредићемо бројањем неутрофилних гранулоцита, макрофага и лимфоцита за сваки пресек појединачно. Затим ћемо израчунати просечан број појединих ћелијских типова по mm^2 периапексних лезија.

Имунохистохемијска анализа експресије IL-33 и ST2 молекула у периапексном ткиву:

Експресију IL-33 и ST2 молекула у здравом периодонталном лигаменту и индукованом периапексном гранулому WT мишева на BALB/c подлози испитаћемо имунохистохемијски коришћењем антимишјег моноклонског анти-IL-33 антитела (енгл. mouse anti-IL-33 antibody [Nessy-1]; ABCAM; ab54385) и зечјег поликлонског анти-ST2 антитела (енгл. rabbit polyclonal anti-ST2 antibody; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; PRS3363). Реакцију ћемо визуелизовати коришћењем LP детекционогкита (TL-015-HD, Thermo Scientific, USA) и хематоксилина. Анализом препарата у програму Image J 1.36 одредићемо број имунопозитивних ћелија по mm^2 периапексних лезија. Сматраћемо да су позитивне оне ћелије које су браон боје, односно то су ћелије које експримирају IL-33 или ST2 молекул.

Изолација мононуклеарних ћелија из периапексних лезија:

Четрнаестог дана од отварања пулпе мандибуларних молара жртвоваћемо мишеве и изоловати десне хеми-мандибуле и цервикалне лимфне чворове. Након уклањања околног меког ткива са хеми-мандибула, изоловаћемо пажљиво периапексно ткиво које окружује коренове првог и другог мандибуларног молара са околном кости у блоку. Изоловане блокове кости третираћемо 60 минута на 37°C у медијуму за дигестију (5 ml/узорку), који садржи 1 mg/ml колагеназе типа IV (енгл. collagenase type IV; Life Technologies, Carlsbad, United States) и 1 mM EDTA (енгл. ethylenediaminetetraacetic acid; Sigma-Aldrich, USA). Издвојене периапексне ћелије, заједно са блоковима кости, центрифугираћемо на 1500 rpm 10 минута, након чега ћемо одлити супернатант, талог ресуспендовати у 5 ml медијума (RPMI-1640, PAA Laboratories GmbH) са 10 % говеђег феталног серума (енгл. fetal bovine serum, FBS), добро извортексовати и пропустити кроз ћелијско сито. Раздвојене ћелије центрифугираћемо на 1500 rpm 10 минута, након чега ћемо одлити супернатант и талог ресуспендовати у 1 ml медијума са 10 % FBS-а. На тај начин ћемо добити ћелијску суспензију коју ћемо користити за проточну цитометрију.

Изолација мононуклеарних ћелија из цервикалних лимфних чворова:

Поступак изолације ћелија из цервикалних лимфних чворова извешћемо на следећи начин: најпре ћемо клипом шприца хомогенизовати лимфне чворове и пропустити кроз ћелијско сито у епрувету од 10ml уз додавање 4 ml медијума који садржи 10 % FBS-а. Овако раздвојене појединачне ћелије центрифугираћемо на 1500 rpm 5 минута. Затим ћемо

одлити супернатант италог ресуспендовати у 500 μ l медијума са 10 % FBS-а. Добијену ћелијску суспензију користићемо за проточну цитометрију.

Анализа популација мононуклеарних ћелија периапексних лезија и дренажућих лимфних чвора проточном цитометријом:

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских анти-мишјих антитела за бојење мембранских маркера (CD3, CD4, CD8, CXCR3, CCR6, CD11c, CD11b, F4/80, CD49b; BD Pharmingen, USA) обележених различитим флуоресцентним бојама (allophycocyanin, APC; fluorescein, FITC; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyl protein complex) одредићемо процентуални удео и укупан број CD3⁺ лимфоцита, CXCR3⁺CD3⁺ и CCR6⁺CD3⁺ лимфоцита, CD4⁺, CD8⁺ лимфоцита, CD49b⁺ NK ћелија, CD49b⁺CD3⁺ NKT ћелија, F4/80⁺ макрофага, CD11c⁺ дендритских ћелија, CD11b⁺ мијелоидних ћелија и CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија. Коришћењем примарно коњугованих моноклонских анти-мишјих анти-цитокинских антитела (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17, IL-4 и IL-5; BD Pharmingen) и анти-мишјег Foxp3 антителаза интрацелуларно бојење одредићемо процентуални удео и укупан број CD4⁺ Т лимфоцита који продукују IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17, IL-4 и IL-5 и CD4⁺Foxp3⁺ регулаторних Т лимфоцита.

Поступак за површинско и интрацелуларно бојење

Стимулација ћелија. Једноћелијске суспензије периапексних лезија и цервикалних лимфних чворова стимулисаћемо додавањем форбол миристат ацетат-а (енгл. Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma; 5 μ l/ml) и јономицина (Ionomycin, Sigma; 10 μ l/ml). Након два сата инкубације (37°C 5% CO₂), додаћемо BD GolgiStopTM (0,7 μ l/ml), што ће блокирати секрецију цитокина и повећати њихову интрацелуларну акумулацију. После шест сати инкубације, два сата само са активаторима, а следећа четири сата са активаторима и инхибиторима транспорта, ћелије ћемо центрифугирати на 1500 rpm 5 минута. Одлићемо супернатант, аталог ресуспендовати у 350 μ l пуфера за бојење (енгл. Staining Buffer; BD). Затим ћемо ћелије пребацити у пластичне епрувете (FALCON round-bottom test tubes, BD).

Бојење површинских антигена. На милион ћелија (1x10⁶) ресуспендованих у пуферу за бојење додаћемо одговарајућу количину примарно коњугованих моноклонских анти-мишјих антитела за бојење мембранских маркера. Да би одвојили специфично од неспецифичног бојења ћелије ћемо инкубирати и са одговарајућим изотипским контролама. Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле, користиће се у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:100. Ћелије ћемо инкубирати 30 минута на +4° C, у мраку.

Фиксација ћелија и пермеабиланизација ћелијске мембране. Након инкубације са примарно коњугованим анти-CD4 моноклонским антителом, ћелије ћемо опрати два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута). Ћелијски талог ћемо ресуспендовати у 250 μ l Cytofix/CytoPermTM раствора (BD Pharmingen) и инкубирати 20 минута на +4°C. Затим ћемо ћелије опрати два пута у Perm/WashTM пуферу (BD Pharmingen; 1ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута).

Бојење интрацелуларних цитокина. Ћелије претходно обојене помоћу анти-CD4 моноклонског антитела, фиксиране и пермеабилзоване, ресуспендоваћемо у 50 μ l Perm/Wash™ пуфера. Додаћемо примарно коњугована анти-citoкинска моноклонска антитела и одговарајуће изотипске контроле. Сва антитела користиће се у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:100. Ћелије ћемо инкубирати 30 минута на +4°C, у мраку. Након инкубације, опраћемо ћелије у Perm/Wash™ пуферу (1ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута), а ћелијски талог ресуспендовати у 350 μ l пуфера за бојење.

Интрацелуларно бојење транскрипционог фактора Foxp3. Први корак у овој процедури је површинско бојење CD4 маркера: на милион ћелија (1×10^6) ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење, додаћемо одговарајућу количину анти-CD4 антитела, у таквој концентрацији да његово финално разблажење буде 1:100. Ћелије ћемо инкубирати 20 минута у мраку на температури од +4°C са поменутиим антителом, а такође и са одговарајућом изотипском контролом. Након инкубације, ћелије ћемо опрати два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута), а ћелијски талог ресуспендовати у 2ml хладног пуфера за фиксацију (енгл. mouseFoxp3 FixationBuffer, BDPharmingen) и инкубиран 30 минута на +4°C у мраку. Затим ћемо ћелије опрати два пута у пуферу за пермеабилзацију (mouseFoxp3 Permeabilizationbuffer, BDPharmingen), загрејаном до собне температуре (2ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута). Након одливања супернатанта уследиће пермеабилзација ћелија у 2ml пуфера за пермеабилзацију, 30 минута у мраку на температури 37°C. По завршеној инкубацији ћелије ћемо опрати у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута). На крају ћемо ћелије инкубирати сакоњугованим анти-мишијем Foxp3 антителом, претходно разблаженим у пуферу за бојење тако да његово финално разблажење буде 1:100. Након инкубације (20 минута у мраку на собној температури) ћелије ћемо опрати у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 1500 rpm 5 минута), а ћелијски талог ресуспендовати у 350 μ l пуфера за бојење.

Ћелије ћемо анализирати на проточном цитометру FACSCalibur (BD Biosciences). За цитометријску анализу користићемо регион (енгл. Gate) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Податке ћемо анализирати помоћу софтвера Flowing Software 2.5 (Informer Technologies).

Врста студије

Тип студије према коме ће бити спроведено истраживање у целини је експериментална студија на животињама *in vivo*

Снага студије и величина узорка

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима деструкције алвеоларне кости у периапексном региону, односно процента моноклеарних ћелија у периапексним лезијама које продукују TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-4 и IL-5, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно

очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група (за процентуалну заступљеност CD4⁺IFN- γ -продукујућих ћелија, Effect size = 0.44), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 35 за сваку од група. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе.

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности коришћењем Shapiro-Wilk теста. Уколико вредности буду имале правилну расподелу коришћењем параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна грешка (Mean \pm SEM). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекујемо да ће делеција гена за ST2 молекул повећати инфлукс мононуклеарних ћелија у периапексни регион BALB/c мишева након индукције лезија и подстакнути CD4⁺T лимфоците да продукују проинфламаторне цитокине (TNF- α , IL-6, IFN- γ и IL-17), што ће узроковати значајно тежудеструкцију периапексне алвеоларне кости. Насупрот томе, очекујемо да ће примена рекомбинантног IL-33 након индукције лезија смањити инфлукс мононуклеарних ћелија у периапекс BALB/c мишева и супримирати CD4⁺T лимфоците да продукују проинфламаторне цитокине. Очекујемо и да ће експресија IL-33 и ST2 молекула бити значајно повишена у индукованом периапексном гранулому у односу на здрави периодонтални лигамент BALB/c мишева.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Користећи ST2 дефицијентне и ST2 позитивне мишеве, као и применом рекомбинантног IL-33 код ST2 позитивних мишева испитаћемо улогу IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија. Расветљавање механизма настанка периапексних лезија, а посебно улоге IL-33/ST2 сигналног пута у овим процесима, може отворити врата креирању нових приступа у терапији овог важног и веома честог патолошког процеса код људи.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације Комисија предлаже Проф. др Александру Лукић, која је редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција. Проф. др Александра Лукић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања.

2.11. Научна област дисертације

Стоматологија. Изборно подручје: Молекулска медицина – подручје: Имунологија, инфламација и инфекција

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. **Проф. др Драгиња Којовић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, члан
3. **Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
4. **Доц. др Татјана Кањевац**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, члан
5. **Доц. др Владислав Воларевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Закључак и предлог комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, др стом. Милена Величковић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Кандидат је овладао целуларним, молекуларним и хистолошким техникама савремених медицинских истраживања које су неопходне за израду ове теме о улози IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др стом. Милене Величковић, под називом “ **Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија** “ и одобри њену израду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник

2. **Проф. др Драгиња Којовић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, члан

3. **Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

4. **Доц. др Татјана Кањевац**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, члан

5. **Доц. др Владислав Воларевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

У Крагујевцу, 07.05.2014. године