

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЛЕНА		17. 01. 2024	Број: _____
Орг. јед.	Број	Број	Број
05	278		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број: IV-03-872/26 од 20.11.2023. именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Наталије Соловјове, под називом:

„Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у експерименталном моделу акутног хепатитиса“

Чланови комисије су

1. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник;
2. др Немања Јовичић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. др Неда Милосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка онкологија, члан.

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидаткиња Наталија Соловјова испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Болести јетре карактерише смрт хепатоцита и последично оштећење ткива јетре. Оштећења јетре могу да буду последица аутоимунских процеса, хроничне употребе алкохола, инфекције, излагања токсинима и лековима. Хепатитис или оштећење јетре изазвано интравенском применом конканавалина А (ConA од енгл. *Concanavalin A*) се углавном користи као експериментални модел за хепатитис у чијој су основи имунски механизми, као што су аутоимунски и вирусни хепатитис. ConA се везује за ендотелне ћелије јетриних синусоида и оштећује их. Затим се ConA везује за Купферове ћелије што за последицу има поликлонску активацију Т лимфоцита. Активирани Т лимфоцити, али и NK и NKT ћелије, у јетри продукују проинфламацијске цитокине TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), IL-17, IFN- γ (*Interferon- γ*) што изазива инфламацију, а затим некрозу хепатоцита и озбиљно оштећење јетре које је праћено повећањем вредности трансминаза у серуму. За лечење аутоимунског хепатитиса се препоручује примена кортикостероиди и азатиоприна, а у случају слабог одговора на ове лекове или интолеранцију, индикована је примена микофенолат мофетила, циклоспорина или инфликсимаба. Примена ових лекова је праћена бројним нежељеним ефектима, а одговор на терапију је индивидуалан па постоје препоруке о персонализованом приступу у лечењу аутоимунског хепатитиса који укључује одговарајући избор и дозирање терапеутика са наизменичном применом потенцијалних терапијских средстава. Као алтернатива или допуна фармаколошким третманима испитују се ефекти функционалне хране. Козје млеко и његови деривати, на првом месту сурутка, су функционална храна која садржи бројне биоактивне супстанце битне за унапређење здравља и превенцију болести. Сурутка садржи есенцијалне аминокиселине и аминокиселине разгранатог ланца у већим концентрацијама у поређењу са биљним изворима протеина. Есенцијалне аминокиселине су укључене у виталне процесе укључујући реакције имунског система. Протеини сурутке (лактопероксидаза, α -лакталбумин, β -лактоглобулин, серумски албумин, имуноглобулини и лактоферин) учествују у имунском одговору, показују антимикробну и антиоксидативну активност. Показано је да суплементација протеинима сурутке редукује маркере инфламације код пацијената са акутним исхемијским оштећењем мозга. Дегалактозилисани протеини сурутке смањују продукцију проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-1 β у мишићем моделу инфламације изазване липополисахаридом. Антиинфламацијска активност протеина сурутке удружена је са редуковањем масних наслага код миша. Такође, у експерименталним студијама показано је да су протеини сурутке смањили оштећење јетре изазвано метотрексатом, оксидативно оштећење јетре изазвано акролеином и хронично оштећење јетре изазвано етанолом, али нема података о потенцијалном протективном ефекту сурутке у оштећењу јетре које у основи има имунске/инфламацијске механизме.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Познато је да козје млеко у поређењу са крављим млеком садржи вишеструко веће концентрације антиоксидативних молекула, протеине веће биолошке вредности, али који су слабији алергени. У овој студији ће се по први пут испитати потенцијални хепатопротективни ефекат протеина лиофилизоване козје сурутке у хепатитису који у основи има имунске механизме.

Овим испитивањем би се експериментално утврдио механизам потенцијалног антиинфламацијског и хепатопротективног дејства протеина козје сурутке у терапији имунским механизмима посредованог хепатитиса. Резултати ове студије би могли да укажу на могућу примену протеина лиофилизоване козје сурутке у терапији вирусних и аутоимунског хепатитиса.

2.3. Наслов, циљ(еви) и хипотеза(е) докторске дисертације

Наслов: „Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у експерименталном моделу акутног хепатитиса“

Основни циљ истраживања је испитивање потенцијалног антиинфламацијског и хепатопротективног ефекта лиофилизоване козје сурутке у моделу акутног хепатитиса мишева изазваног интравенском апликацијом конканавалина А.

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

1. Анализом хистолошких и серумских параметара утврдити утицај лиофилизоване козје сурутке на тежину хепатитиса изазваног конканавалином А.
2. Анализирати утицај оралне примене лиофилизоване козје сурутке пре апликације Con A на експресију про- и анти- оксидативних и антиинфламацијских ензима у јетри.
3. Испитати утицај претретмана лиофилизованом козјом сурутком на експресију маркера активације ендотела у јетри мишева са Con A хепатитисом.
4. Анализирати утицај претретмана лиофилизованом козјом сурутком на састав и фенотипске карактеристике имунских ћелија које инфилтришу јетру мишева са Con A хепатитисом.
5. Испитати утицај претретмана лиофилизованом козјом сурутком на профил цитокина у јетри мишева са Con A хепатитисом.

Радне хипотезе испитивања:

1. Примена лиофилизоване козје сурутке *per os* ублажава хистолошке и серумске параметре хепатитиса.

2. Примена лиофилизоване козје сурутке *per os* пре апликације Con A смањује експресију прооксидативних ензима и повећава експресију антиоксидативних и хепатопротективних ензима у јетри мишева са Con A хепатитисом.
3. Претретман лиофилизованом козјом сурутком смањује активацију ендотела у јетри мишева са Con A хепатитисом.
4. Претретман лиофилизованом козјом сурутком смањује активацију ћелија урођене имуности (макрофага и дендритских ћелија) у јетри што је удружено са слабијом активацијом Т лимфоцита и диференцијацијом у Th1 и Th17 ћелије у јетри мишева којима је апликован ConA.
5. Претретман лиофилизованом козјом сурутком смањује експресију инфламацијских, а повећава експресију антиинфламацијских цитокина у јетри мишева са Con A хепатитисом.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Планирано истраживање је експериментална студија на животињама *in vivo* и *ex vivo* на ћелијама изолованим из експерименталних животиња.

2.4.2. Популација која се истражује

Експерименталне животиње. Истраживање ће се обавити на мужјацима соја C57BL/6 старим 8 недеља, виваријума Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и уз одобрење Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Мишеви ће бити подељени у следеће групе:

1. Група C57BL/6 мишева који ће током 5 дана примати *per os* лиофилизовану козју сурутку и којима ће се 30 минута после последње дозе сурутке интравенски апликовати ConA
2. Група C57BL/6 мишева којима се интравенски апликује ConA
3. Група C57BL/6 мишева који ће током 5 дана примати *per os* лиофилизовану козју сурутку и којима ће се 30 минута после последње дозе сурутке интравенски апликовати физиолошки раствор
4. Група C57BL/6 мишева којима се интравенски апликује физиолошки раствор

2.4.3. Експериментални тестови и анализе

Индуковање хепатитиса, примена лиофилизоване козје сурутке и евалуација болести. Фулминантни облик хепатитиса ће се изазвати интравенском применом ConA у дози 12,5 mg/kg ТТ, раствореног у физиолошком раствору у укупној запремини 200 μ L.

Лиофилизовану козју сурутку (добијену поступком стандарне лиофилизације, комерцијално доступну) мишеви ће примити *per os* пет дана за редом у дози 1 g/kg. Доза сурутке и динамика примене су преузети из студија сличног дизајна. Биохемијским и хистопатолошким анализама процениће се степен оштећења јетре. У серуму испитиваних животиња, коришћењем аутоматизованог биохемијског анализатора, мериће се концентрације ензима AST и ALT (2, 4, 12 и 24 сата после примене ConA). За хистопатолошку анализу јетре користиће се исечци добијени 8 и 24 сата после примене ConA обојени хематоксилином и еозином. Процент некротичног ткива јетре ће се одредити семиквантитативном методом, као што је раније описано у ранијим радовима. Активност лактат дехидрогеназе у хомогенату јетре ће се одредити коришћењем стандардног колориметријског кита. Из ткива јетре третираних мишева ће се издвојити RNA и RT PCR методом ће се анализирати експресија про- и анти- апоптотских молекула Вах и Bcl-2.

Мерење цитокина у хомогенатима јетре. По екстирпацији, делић јетре тежине 100mg, хомогенизоваће се у 0,5mL PBS-а (енгл. *Phosphate Buffered Saline*), а потом центрифугирати на 14000G, 10 минута, на температури од 4°C. Концентрације цитокина у супернатантима јетре ће се одредити помоћу мишјих *Duoset enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) китова за TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4, IFN- γ и IL-17 (R&D Systems) према упутствима произвођача.

Испитивање утицаја лиофилизоване козје сурутке на експресију про- и анти-оксидативних, антиинфламацијских и хепатопротективних ензима у јетри. Из јетри мишева изоловаће се РНК и методом RT PCR ће се анализирати експресија гена који кодирају: NADPH-оксидазе (Nox2, p22^{phox}, p47^{phox} и p65^{phox}) антиоксидативне ензиме (Sod1, Sod2, Sod3) и антиинфламацијски и хепатопротективни ензим Но-1.

Испитивање утицаја лиофилизоване козје сурутке на експресију маркера активације ендотела у јетри. Из ткива јетре третираних мишева ће се издвојити RNA и RT PCR методом ће се анализирати експресија ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и P-селектина.

Изоловање инфилтришућих мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија. Ћелије ће бити издвојене из ткива јетре као што је то раније описано (15). Мононуклеарне ћелије ће се детектовати помоћу моноклонских антитела (обележених флуоресцентним бојама) специфичних за: CD4, CD8 α , TCR β , F4/80, CD11b, CD11c, CD86, CD3. За интрацелуларна бојења антителима за IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10, IL-17 и IFN- γ , ћелије ће претходно бити активисане PMA/јономицином. Обележене ћелије ће бити анализиране помоћу *FACSCalibur* проточног цитометра (BD *Biosciences*), а анализа обављена коришћењем програма *FlowJo* (*Tree Star*).

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Независна варијабла: орална примена лиофилизоване козје сурутке.

Зависне варијабле: процент некротичног ткива, концентрације трансаминаза у серуму, концентрације цитокина, проценти активираних и инфламацијских макрофага и

лимфоцита и ниво експресије ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, P-селектина, Nox2, p22^{phox}, p47^{phox} и p65^{phox}, Sod1, Sod2, Sod3, Ho-1, Вах и Bcl-2 у ткиву јетре.

2.4.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима аланин трансминазе добијеним у прелиминарном експерименту. Студијски узорак је израчунат узимајући вредност за алфа 0,05 и за снагу студије 0,8 за *Student*-ов *t* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 10 за сваку од група, како је за сваку од 4 групе предвиђено жртвовање у 5 времена након примене конканавалина А, укупно је планирано 200 мишева. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student*-ов *t* тест за два независна узорка) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

2.4.6. Статистичка анализа

Добијени резултати ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне девијације (или стандардне грешке). Статистичка значајност ће се одређивати *Student*-овим *t* тестом, а по потреби и *Mann-Whitney*-евим *U* test. Статистичка значајност ће бити претпостављена за $p=0,05$. Све статистичке анализе ће бити обављене употребом програма SPSS 20.0.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Планираним испитивањем би се детаљније испитали механизми хепатопротективног и антиинфламацијског ефекта протеина лиофилизоване козје сурутке и експериментално би се потврдио значај протеина лиофилизоване козје сурутке у терапији имунским механизмима посредованог хепатитиса, као што је вирусни хепатитис, и указало би се на могућу примену ових протеина у терапији аутоимунског хепатитиса.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Познато да протеини сурутке смањују продукцију инфламацијских цитокина IL-1 β и TNF- α и тако остварују антиинфламацијски ефекат *in vivo*, па се очекује слабија активација ендотела крвних судова јетре мишева који су примили лиофилизовану козју сурутку пре индукције хепатитиса, слабија активација инфламацијских макрофага и дендритских ћелија у јетри и последично слабије развијена инфламација у јетри са мањим оштећењем хепатоцита. Очекује се и да лиофилизована козја сурутка утиче на повећање експресије антиоксидативних и хепатопротективних ензима у јетри.

Потенцијални терапијски ефекти протеина сурутке до сада нису испитани *in vivo* у експерименталним моделима хепатитиса у чијој су основи имунски механизми. Такође, потенцијални хепатопротективни ефекти лиофилизоване козје сурутке, за коју је показано

да има вишеструко већи садржај имуномодулаторних и антиинфламацијских молекула и доста бољу толеранцију у поређењу са протеинима кравље сурутке, до сада нису испитани у експерименталним моделима *in vivo*.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Наталиа Соловјова је рођена 07.07.1963. године у Руској Федерацији. Медицински факултет на Медицинском институту у Кемерову уписала је 1980/1981. и успешно завршила 1985/1986. године. Школске 2018. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положила је све испите на докторским студијама.

Од 2004. године запослена на Вишој медицинској школи у Београду, која је од 2020. године реорганизована у Академију струковних студија Београд, одсек Висока Здравствена школа.

Члан је Српског друштва за имунологију, молекулску имунологију и регенеративну медицину и члан СЛД секције физикалне медицине и рехабилитације.

Кандидаткиња је објавила рад у целини у часопису категорије M21 у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Dimitrijević JD[†], Solovjova N[†], Bukonjić AM, Tomović DL, Milinković M, Čaković A, Bogojeski J, Ratković ZR, Janjić GV, Rakić AA, Arsenijević NN, Milovanović MZ, Milovanović JZ, Radić GP, Jevtić VV. Docking Studies, Cytotoxicity Evaluation and Interactions of Binuclear Copper(II) Complexes with S-Isoalkyl Derivatives of Thiosalicylic Acid with Some Relevant Biomolecules. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 6;24(15):12504. **M21**

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Јелена Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија. 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 (проф. др Јелена Миловановић)

1. **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.

2. Arsenijevic A, **Milovanovic J**, Stojanovic B, Djordjevic D, Stanojevic I, Jankovic N, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Milovanovic M. Gal-3 Deficiency Suppresses *Novosphingobium aromaticivorans* Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. *Front Immunol.* 2019;10:1309.
3. Arsenijevic D, Stojanovic B, **Milovanovic J**, Arsenijevic A, Simic M, Pergal M, Kodranov I, Cvetkovic O, Vojvodic D, Ristanovic E, Manojlovic D, Milovanovic M, Arsenijevic N. Hepatoprotective Effect of Mixture of Dipropyl Polysulfides in Concanavalin A-Induced Hepatitis. *Nutrients.* 2021;13(3):1022.
4. Stojanovic B, **Milovanovic J**, Arsenijevic A, Stojanovic B, Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML, Milovanovic M. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection. *Front Microbiol.* 2019;10:185.
5. Silconi ZB, Rosic V, Benazic S, Radosavljevic G, Mijajlovic M, Pantic J, Ratkovic ZR, Radic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Arsenijevic N, **Milovanovic J**. The Pt(S-pr-thiosal)₂ and BCL1 Leukemia Lymphoma: Antitumor Activity In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8161.

4. Научна област дисертације

Медицина.

Предмет истраживања односи се на утврђивање потенцијалног терапијског ефекта протеина козје сурутке у мишјем моделу хепатитиса који у основи има имунске механизме.

Предмет истраживања, циљ и постављене хипотезе и методолошки приступ истраживању су међусобно усклађени, а предложени ментор има научне компетенције које су подударне са предметом истраживања.

5. Научна област чланова комисије

1. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник;
2. др Немања Јовичић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. др Неда Милосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка онкологија, члан.

Сви предложени чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Наталије Соловјове имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

Закључак

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикацију др Наталије Соловјове, 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.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Наталије Соловјове, под називом „Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у експерименталном моделу акутног хепатитиса“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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



2. др Немања Јовичић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;



3. др Неда Милосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка онкологија, члан.


