

NAUČNI NASTAVNI VEŠTAČENJE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veštačenja Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 25.12.2014. godine, broj 4600/12, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Modulacija diferencijacije i funkcije humanih Langerhansovih ćelija monocitnog porekla in vitro“

kandidata dr Ivana M. Rajkovića, zaposlenog na Vojnomedicinskoj Akademiji u Beogradu kao saradnik u nastavi na katedri za fiziologiju. Mentor je Prof. dr Vladimir Trajković, a komentor je Akademik prof. dr Miodrag Stolić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dušan Popadić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Miloš Marković, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dejan Baskić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veštačenju u Medicinskog fakulteta sledeći

Izveštaj za ocenu i odbranu uradjene doktorske disertacije

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija pod naslovom: „*Modulacija diferencijacije i funkcije humanih Langerhansovih elija monocitnog porekla in vitro*“ obuhvata 187 strana teksta, 6 slika, 9 tabela i 23 grafikona. Tekst je sastavljen od 10 poglavlja: Uvod (30 strana), Hipoteze i ciljevi (3 strane), Materijali i metode (15 strana), Rezultati (55 strana), Diskusija (29 strana), Zaključci (3 strane), Literatura (20 strana), Prilozi (25 strana), Biografija autora (2 strane) i Izjave (5 strana).

Predmet ove doktorske disertacije je uspostavljanje protokola za diferencijaciju humanih Langerhansovih elija (L) od monocita *in vitro* (MoL) i ispitivanje različitih protokola za indukciju njihovog sazrevanja u cilju iznalaženja najoptimalnijih uslova za sticanje imunogenih karakteristika. Maturacija MoL je stimulirana standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora (TNF- α , IL-6, IL-1 i PGE₂), odnosno pojedinačno ili kombinovanom primenom Poly(I:C) (agoniste Toll-ubinskih receptora 3 (TLR-3)), curdlan-a (agoniste dectin-1/Langerin receptora) i solubilnog liganda za CD40 molekula (sCD40L) u različitim vremenskim terminima. Sazrevanje MoL je ispitivano na osnovu njihovih fenotipskih svojstava, produkcije citokina, sposobnosti alostimulacije i polarizacije imunskog odgovora CD4⁺ T-limfocita u pravcu Th1, Th2, Th17 i regulatornih T limfocita, a potom su na osnovu iznetih osobina ove elije upoređivane sa konvencionalnim humanim dendritskim elijama (D) dobijenim od monocita *in vitro* (MoD).

B. Kratak opis postignutih rezultata

Stimulacija nezrelih (n)MoL standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora je dovela do povećanja ekspresije HLA-DR, CD83, CD86, CD54 i CCR7 molekula. Zrele (z)MoL su snažnije indukovale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-13 i TGF- β , a slabije IL-10, u kokulturmama sa CD4⁺ T limfocitima, a u poređenju sa nMoL. Proliferacijska sposobnost alogernih CD4⁺ T-limfocita stimuliranih zMoL je bila slabija u odnosu na CD4⁺ T-limfocite kultivirane sa nMoL. zMoL su slabije ekspimirale HLA-DR, CD54 i CCR7 u poređenju sa

zMoD . zMoL su snažnije stimulisale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-4 i TGF- β , a slabije IL-13. Odnos u produkciji IFN- γ / IL-13 je bio veći i u kokulturi zMoL u poređenju sa zMoD . Alostimulacijski potencijal zMoL je bio snažniji u poređenju sa zMoD .

Kombinovani tretman Poly(I:C) i curdlanom je doveo do povećanja ekspresije CD40, CD80 i CCR7 molekula na MoL u poređenju sa elijama koje su bile pojedinačno stimulisane ovim agonistima. MoL stimulisane kombinacijom agonista su snažnije indukovale produkciju IL-2 i ispoljile snažniji alostimulacijski potencijal, slabije su indukovale produkciju IL-4 i IL-10, a odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T limfocitima bio je veći, u poređenju sa kokulturama pojedinačno stimulisanih MoL .

MoL pretretirane Poly(I:C) i curdlanom su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije stimulisale produkciju IFN- γ , zbog čega je odnos IFN- γ / IL-4 bio veći i u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima u poređenju sa pojedinačno stimulisanim MoL . Ligacija CD40 molekula na MoL pretretiranim Poly(I:C) i curdlanom dovela je do povećanja ekspresije HLA-DR, CD40 i CCR7 molekula u odnosu na MoD , kao i snažnije produkcije IL-12, IL-10, IL-23 i TNF- α . Ove MoL su snažnije indukovale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-17 i IL-10, slabije su stimulisale produkciju IL-4 i TGF- β i pokazale jači alostimulacijski potencijal, u poređenju sa MoD .

C. Analiza doktorske disertacije

Na početku *Uvodnog poglavlja* ove disertacije kandidat nas upoznaje sa istorijatom otkrića i istraživanja L , definiše „paradigmu“ L i pravi kratki osvrt na moguću u terapijsku primenu ovih elija. U *prvom delu* uvoda su opisane najzastupljenije metode izolacije i diferencijacije L . Stalna optimizacija ovih metoda ima za cilj obezbeđivanje dovoljnog broja L za proučavanje njihove diferencijacije i maturacije, kako bi se mogle koristiti u terapijske svrhe. *Drugi deo* uvoda je posvećen ontogenezi i homeostazi epidermalnih L . U *trećem delu* uvoda kandidat opisuje molekularne mehanizme uticaja Poly(I:C) i curdlan-a, supstanci sa imunomodulacijskim delovanjem, na maturaciju D in vitro. U *četvrtom delu* uvodnog poglavlja razmatrane su fenotipske i funkcionalne promene L u toku migracije u obližnje limfne čvorove. *Peti i šesti deo* uvoda govore o osobinama prezentacije antigena CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocitima od strane L i ulozi interakcije CD40/CD40L u ovim procesima. U poslednjem, *sedmom delu*

uvodnog poglavlja kandidat daje koncizan pregled dosadašnjih saznanja o preventivnom i terapijskom značaju L , sa posebnim osvrtom na njihovu potencijalnu primenu kao D vakcine.

Na osnovu preliminarnih ispitivanja i literaturnih podataka iznetih u *Uvodu*, kandidat je definisao dve radne hipoteze i četiri cilja za njihovo dokazivanje koje su iznete u poglavlju *Hipoteze i ciljevi*.

Radne hipoteze su definisane na sledeći način: 1. Sposobnost polarizacije imunskog odgovora $CD4^+$ T limfocita od strane MoL zavisi od: a) vrste faktora koji indukuju maturaciju MoL, b) pojedinačne ili kombinovane primene faktora maturacije, c) vremenskog perioda izlaganja celijama faktorima maturacije i d) dodatne ligacije CD40 molekula; 2. Razlike u potencijalu MoL i MoD da indukuju polarizaciju imunskog odgovora $CD4^+$ T-limfocita u prisustvu istih stimulatora ili njihove kombinacije su posledica: a) različite ekspresije markera maturacije i kostimulacijskih molekula na ovim populacijama, b) produkcije citokina sa različitim proinflamacijskim, imunogenim ili tolerogenim svojstvima i c) različite osetljivosti D na ligaciju CD40 molekula.

Za proveru hipoteza postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja: 1. Ispitati i uporediti efekat koktela proinflamacijskih medijatora (IL-1, TNF-, IL-6, PGE_2) na sazrevanje, produkciju citokina, alostimulacijsku i Th polarizacijsku sposobnost humanih MoL i MoD; 2. Ispitati i uporediti efekat pojedinačne i kombinovane primene agonista TLR3 (Poly(I:C)) i dectina-1/Langerina (curdlan) na sazrevanje, produkciju citokina, alostimulacijsku i Th polarizacijsku sposobnost humanih MoL i MoD; 3) Ispitati uticaj ligacije CD40 molekula na sazrevanje, produkciju citokina, alostimulacijsku i Th polarizacijsku aktivnost humanih MoL i MoD i uporediti ove efekte; 4) Ispitati i uporediti procese sazrevanja, produkcije citokina, aloreaktivnost i Th polarizacijske sposobnosti MoL i MoD nakon kombinovane stimulacije ovih celija Poly(I:C), curdlanom i sCD40L.

U poglavlju *Materijali i metode* kandidat je opisao supstance, eksperimentalne tehnike i metodologiju korišćenu u izradi teze.

nMoD su dobijene šestodnevnom kultivacijom monocita izolovanih adherencijom iz leukocitne frakcije periferne krvi („buffy coat) u diferencijacionom medijumu sa GM-CSF i IL-4, dok su nMoL dobijene dodavanjem TGF- β_1 u ovaj medijum. Fenotipske karakteristike MoD i MoL su određivane imunohistohemijski i metodom protone citofluorimetrije na osnovu analize vezivanja monoklonskih antitela usmerenih prema površinskim molekulima.

Produkcija citokina u kulturama ovih elija, kao i u njihovim kokulturama sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima izmerena je ELISA metodom ili metodom citofluorimetrije pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-citokinskim antitelima. Alostimulacijska sposobnost MoD i MoL je procenjena u mešanoj kulturi sa CD4⁺ T-limfocitima alogenog davaoca nakon analize ugradnje radioaktivnog timidina (³H-timidin) u proliferišu e limfocite. Dobijeni rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i/ili analizom varijanse (ANOVA).

Opisane metode diferencijacije, odnosno ispitivanja fenotipskih i funkcionalnih karakteristika dendritskih elija, u skladu su sa savremenim pristupom u imunobiološkim istraživanjima i odgovaraju postavljenim ciljevima ove disertacije.

U poglavlju **Rezultati** kandidat je dobio eksperimentalne podatke organizovao u šest zasebnih celina:

Zrele (z)MoL su snažnije ispoljile HLA-DR, CD83, CD86, CD54 i CCR7 molekule u pore enju sa nMoL, odnosno, ja e su od njih indukovale produkciju IFN- IL-2, IL-4, IL-13 i TGF-, a slabije IL-10, u elijskim kulturama sa CD4⁺ T-limfocitima. Proliferacijska sposobnost alogenih CD4⁺ T-limfocita stimulisanih zMoL je bila slabija u odnosu na CD4⁺ T-limfocite kultivisane sa nMoL.

Procenat Langerin⁺ elija u populaciji nMoL (84.5 ± 7.7 %) bio je značajno veći od Langerin⁺ elija u populaciji nMoD (6.4 ± 2.1 %). Dok je CD14 molekul bio gotovo nedetektabilan na obe subpopulacije D, dotle je CD1a molekul bio eksprimiran na gotovo svim ispitivanim nMoL, odnosno na polovini nMoD. zMoL su slabije eksprimirale HLA-DR, CD54 i CCR7 u pore enju sa zMoD. zMoL su snažnije stimulisale produkciju IFN-, IL-2, IL-17, IL-4 i TGF-, a slabije IL-13. Odnos u produkciji IFN- / IL-13 je bio veći u kokulturi zMoL u pore enju sa zMoD. zMoL su snažnije indukovale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u pore enju sa zMoD.

Kombinovani tretman Poly(I:C) i curdlanom je doveo do povećanja ekspresije CD40, CD80 i CCR7 molekula na MoL u pore enju sa elijama koje su bile pojedinačno stimulisane ovim agonistima. MoL stimulisane kombinacijom agonista su snažnije stimulisale produkciju IL-2, ja e su indukovale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita i slabije su indukovale produkciju IL-4 i IL-10, u odnosu na pojedinačno stimulisane MoL. Odnos u produkciji IFN- / IL-4 bio je veći u kokulturi kombinovano stimulisanih MoL sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u pore enju sa kokulturom pojedinačno stimulisanih MoL.

MoL stimulirane Poly(I:C) i curdlanom su snažnije produkovale IL-10 i TNF- α , a slabije IL-12, IL-23, IL-27 i IL-1, u poređenju sa MoD, odnosno slabije su indukovale sekreciju IFN- γ i IL-17 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima.

MoL pretretirane Poly(I:C) i curdlanom su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije stimulisale produkciju IFN- γ i indukovale veći odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa pojedinačno stimuliranim MoL.

Ligacija CD40 molekula na MoL pretretiranim Poly(I:C) i curdlanom je dovela do povećanja ekspresije HLA-DR, CD40 i CCR7 molekula u odnosu na MoD, kao i snažnije produkcije IL-12, IL-10, IL-23 i TNF- α . Ove MoL su snažnije indukovale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-17 i IL-10, slabije su stimulisale produkciju IL-4 i TGF- β i jače indukovale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita, u poređenju sa MoD.

U poglavlju ***Diskusija***, kandidat je objasnio dobijene rezultate poredbe i ih sa oskudnim literaturnim podacima dosadašnjih studija posvećenih protokolima maturacije MoL. Kandidat je analizirao na koji način bi pokazana fenotipska i funkcionalna plastičnost MoL omogućila njihovo uključivanje u razvoj protokola za dobijanje vakcina baziranih na D. Budući da MoL, u zavisnosti od vrste tretmana, mogu da ispolje i imunoregulacijski potencijal, njihova terapijska primena bi, osim od vrste bolesti, zavisila i od faze bolesti (nivoa aktivacije imunskog sistema i stepena inflamacije koji karakterišu određeni klinički stadijum bolesti) i individualne reakcije svakog pacijenta i trebalo bi da se prilagodi svim navedenim parametrima. To ukazuje da bi presudni uslovi za primenu MoL umesto MoD bili vremenska i prostorna stabilnost fenotipskih i funkcionalnih karakteristika MoL, za koje je procenjeno da su terapijski povoljne, nakon njihove *in vivo* aplikacije kao adjuvanasa u vakcinama. D koje se koriste za pripremanje *ex vivo* antitumorskih i antiinfektivnih vakcina treba da imaju snažnu i stabilnu produkciju IL-12, da nakon unakrsne prezentacije antigena T-limfocitima polarizuju naivne CD4⁺ T-limfocite u Th1 smeru i aktiviraju naivne CD8⁺ T-limfocite u specifične efektorske limfocite (CTL), kao i da mogu da pokrenu adekvatne memorijske imunске odgovore. Posebna vrednost diskusije ovog rada ogleda se u činjenici da je kandidat, zahvaljujući temeljnom poznavanju ove oblasti, uspeo da originalne rezultate svog rada poveže u celinu, i ukaže na njihov potencijalni značaj u okviru postavljenih ciljeva. Time je dao veliki doprinos izuavanju ove izuzetno značajne teme.

Najvažnije zaključke istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji kandidat je prikazao u poglavlju **Zaključci**.

Kandidat je zaključio da tretman MoL koktelom proinflamacijskih medijatora povećava fenotipsko sazrevanje i ekspresiju CCR7 molekula na ovim ćelijama, stimuliše Th1 i Th2 imunski odgovor, ali snižava njihov alostimulacijski potencijal. MoL tretirane koktelom proinflamacijskih medijatora pokazuju snažniju sposobnost indukcije Th1 i Th17 imunskog odgovora, ali i slabiji alostimulacijski potencijal i slabiju ekspresiju CCR7 molekula u odnosu na MoD.

MoL stimulisan kombinacijom Poly(I:C) i curdlana ispoljavaju snažniji alostimulacijski potencijal, kao i snažniju sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora, a slabije indukuju produkciju IL-10, u poređenju sa MoL koje su stimulisan pojedinačnim agonistima. MoL tretirane ovom kombinacijom agonista ispoljavaju snažniji alostimulacijski potencijal i snažniju indukciju IL-10 i TGF- β , a manju sposobnost indukcije Th17 imunskog odgovora u odnosu na MoD.

MoL pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana nakon aktivacije CD40 molekula ispoljavaju snažniju sposobnost alostimulacije i indukcije Th1 imunskog odgovora u poređenju sa MoL pojedinačno pretretiranim Poly(I:C) ili curdlanom. U istim uslovima povećana je njihova alostimulacijska sposobnost i potencijal za indukciju Th1 i Th17 imunskog odgovora, ali i produkcija IL-10, u poređenju sa MoD.

Opisani na ini modulacije fenotipskih i funkcionalnih karakteristika MoL predstavljaju dobru polaznu osnovu u uspostavljanju protokola za dobijanje imunokompetentnih L koje bi se koristile u terapijske svrhe.

U poglavlju **Literatura** kandidat je citirao --- bibliografskih jedinica iji sadržaj ukazuje na analitički pristup istraživanju i sveobuhvatno sagledavanje predmeta istraživanja.

Naučna relevantnost disertacije dolazi do izražaja u poslednjem poglavlju **Prilozi**, gde su navedeni objavljeni radovi kandidata koji su proistekli upravo iz rezultata dobijenih u toku rada na ovoj disertaciji.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

Ivan M. Rajković je do sada bio autor ili koautor u 2 naučne publikacije međunarodnog značaja, kao i u 3 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 2 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

M20 - Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja

M21 – Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Tanja Džopali , Ivan Rajković , Ana Dragičević , Miodrag Čolić . The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunology Res.* 2012; 52(1-2): 20-33.

M22 - Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. Ivan Rajković , Ana Dragičević , Saša Vasilijić , Biljana Božić , Tanja Džopali , Sergej Tomić , Ivana Majstorović , Dragana Vučković , Jelena Čokić , Bela Balint, Miodrag Čolić . Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells. *Immunology* 2011; 132(2): 217-25.

M30 – Zbornici sa međunarodnih naučnih skupova

M32 - Predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. Rajković I, Dragicević A, Vasilijević S, Vučković D, Božić B, Mihajlović D, Marković M and Čolić M (2013). Co-ligation of TLR3 and Dectin-1 agonists potentiates Th1 polarization capability on monocyte derived Langerhans cells in vitro. *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00124.
2. Rajković I, Dragicević A, Vasilijević S, Vučković D, Božić B, Mihajlović D, Marković M and Čolić M. Co-ligation of TLR3 and Dectin-1 agonists potentiates Th1 polarization capability on monocyte derived Langerhans cells in vitro. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation. Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach. Belgrade, October 29-31, 2014. Abstract book, p41.

M34 - Saopštenje sa skupa međunarodnog značaja štampano u izvodu

1. Rajković I, Dragičević A, Vasilijević S, Božić B, Džopali T, Tomić S, Majstorović I, Vučković D, Čokić J, Balint B, Čolić M. Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte derived dendritic cells and monocyte derived Langerhans-like cells. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 23-27 August 2010. *Int Immunol* 2010, 22(supp 1): ii18. Abstract book, PP-024-63.

M60 – Zbornici sa skupova nacionalnog značaja

M64 - Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu

1. **Rajkovi I**, Dragičević A, Vasilijević S, Božić B, Džopalić T, Tomić S, Majstorović I, Vučković D, Djokić J, Balint B, Čolić M. Razlike u sposobnosti indukcije Th imunog odgovora između dendritskih ćelija i Langerhansovih ćelija dobijenih in vitro od humanih monocita. VI Naučni sastanak Društva imunologa Srbije, Beograd 05. 05. 2011. Program i zbornik sažetaka, abstrakt PO12, str. 46.
2. **Rajkovi I**, Dragičević A, Vasilijević S, Božić B, Džopalić T, Tomić S, Majstorović I, Vučković D, Djokić J, Balint B, Čolić M. Razlike u sposobnosti indukcije Th imunskog odgovora između dendritskih ćelija i Langerhansovih ćelija dobijenih in vitro od humanih monocita. Svetski dan imunologije, SANU, Beograd, 24.04.2012.

E. Zaključak

Analiza doktorske disertacije dr Ivana M. Rajkovića ukazuje da je kandidat uspešno ispunio postavljene ciljeve istraživanja. Kandidat je pokazao dobro poznavanje naučne oblasti u okviru koje su sprovedena istraživanja, sposobnost samostalnog planiranja i izvođenja eksperimenata, kao i analitički pristup prilikom donošenja zaključaka iz dobijenih rezultata na osnovu dostupnih literaturnih podataka.

Doktorska disertacija Ivana M. Rajkovića predstavlja originalan naučni doprinos na polju istraživanja maturacijskih protokola za dobijanje zrelih MoL koje bi mogle da na u potencijalnu primenu u imunoterapiji baziranoj na D kao vakcinama. Ova teza je pokazala da adekvatno stimulisane MoL mogu da dovedu do proliferacije CD4⁺ T-limfocita i da indukuju njihovu polarizaciju u Th1 i/ili Th17 smeru, što su neki od važnih preduslova za uspostavljanje efikasnog antitumorskog i antiinfektivnog imunskog odgovora. Dobijeni rezultati ukazuju, takođe, na značajnu fenotipsku i funkcionalnu plastičnost MoL koje istovremeno mogu da ispolje i imunoregulacijski potencijal, zbog čega bi njihova terapijska primena, osim od vrste, zavisila i od faze bolesti, odnosno morala bi se prilagoditi svakom pacijentu u zavisnosti od nivoa aktivacije imunskog sistema i stepena inflamacije. U skladu sa tim, presudni uslovi za razmatranje potencijalne primene MoL umesto MoD, kao ćelijskih adjuvanasa u vakcinama, bili bi duža vremenska i veća prostorna stabilnost terapijski povoljnih fenotipskih i funkcionalnih karakteristika MoL nakon tretmana maturacijskim agensima.

Na osnovu svega navedenog, predlažemo Naučno-nastavnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i odobri javnu odbranu doktorske disertacije

kandidata dr Ivana M. Rajkovi a pod naslovom: “Modulacija diferencijacije i funkcije humanih Langerhansovih elija monocitnog porekla *in vitro*.”

U Beogradu, 18.03.2015.

Mentor:

dr Vladimir Trajkovi

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu _____

Komentor:

akademik dr Miodrag oli

Redovni profesor Medicinskog fakulteta VMA Univerziteta odbrane u Beogradu i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu _____

lanovi komisije:

dr Dušan Popadi

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu _____

dr Miloš Markovi

Docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu _____

dr Dejan Baski

Vanredni profesor Fakulteta Medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu _____