

## 1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-6102/3-6, од 08.06.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Бојана Стојановића, под називом:

### „ Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса“

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 ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан
3. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
4. **Проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. **Проф. др Јасна Јевђић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи

## 2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

### 2.1. Кратка биографија кандидата

Бојан Стојановић је рођен 01.01.1986. године у Призрену. Основну школу и Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршио је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2004/2005. године, а дипломирао 2010. године, са просечном оценом 9,81 (девет и 81/100) и тиме стекао звање доктора медицине. Обавио је обавезни лекарски стаж и положио стручни испит 2011. године. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија, уписао је 2010. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Усмени докторски испит је положио у септембру 2012. године са оценом 10 (десет).

Од новембра 2011. године ради као сарадник у настави на Катедри за Хирургију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. У фебруару 2014. године изабран је у звање истраживача сарадника за ужу научну област Хирургија. У школској 2013/2014. години уз сагласност Министарства здравља Републике Србије и Факултета медицинских

наука у Крагујевцу уписао је специјалистичке студије из области Хирургије. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** „ Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса“

**Предмет:** Утврђивање улоге галектина 3 (Gal-3) у патогенези акутног панкреатитиса и развоју локалних и системских компликација болести.

**Хипотеза:** Галектин 3 игра протективну улогу у ацинусним ћелијама панкреаса, те одсуство Gal-3 чини C57BL/6 мишеве осетљивијим на развој експерименталног акутног панкреатитиса. Позната је про-инфламацијска улога Gal-3 у акутној инфламацији, попут експерименталног модела фулминантног хепатитиса индукованог применом конканавалина А и аутоимунским болестима попут експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

## 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је као први аутор објавио рад у целини у часопису категорије M52 који излази на једном од водећих светских језика, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

**Stojanovic B, Spasic M, Radosavljevic I, Canovic D, Radovanovic D, Praznik I, Prodanovic N, Milojevic A, Jelic I, Babic Z, Artinovic V, Grubor I, Nikolic Lj, Vucicevic K, Miljkovic J, Divjak A, Stefanovic S and Jankovic S.** Risk factors for development of acute necrotizing pancreatitis. *Serb J Exp Clin Res* 2015; 16(2):121-129 (**M52**)

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Галектин 3 је члан убиквитираних лектина који се високим афинитетом везују за  $\beta$ -галактозиде. То је гликопротеин карактеристичне структуре који је као слободан у облику мономера, а након везивања за олигосахариде формира пентамере услед интеракције аминок-терминалних домена. Gal-3 игра улогу у регулацији ћелијске пролиферације, диференцијације и апоптозе. Овај лектин модулира урођени и стечени имунски одговор. Gal-3 је уључен у многе процесе акутне инфламације попут активације, адхезије и екстравазације неутрофила. Активирани макрофаге експримирају и секретују Gal-3, који игра улогу у фагоцитози као компонента фагозома и као опсонин, у хемотакси моноцита и макрофага и у алтернативној активацији макрофага. Gal-3 активира мастоците, има улогу у миграцији и интеракцији дендритских ћелија и лимфоцита. Дендритске ћелије Gal-3 дефицијентних мишева продукују више IL-12 што указује да Gal-3 супримира продукцију овог цитокина и развој Th1 ( енгл. *helper T, Th1*) имунског одговора. Секретовани Gal-3 унакрсним везивањем за површинске гликопротеине узрокује стварање кисеоничких радикала у неутрофилима и дегранулацију мастоцита.

Акутни панкреатитис (АП) је акутно ензимско запаљење панкреаса. Услед активације протеолитичких и липолитичких ензима настаје аутодигестија панкреаса али и перипанкреатичног масног ткива. Главни етиолошки фактори који узрокују АП у 70-80% случајева су билијарна калкулоза и употреба алкохола. У преосталих 20-30% су други узроци, попут метаболичких поремећаја, примена неких лекова, инфективни узроци. Осим тога АП може бити и идиопатски. Клинички, акутни панкреатитис се може манифестовати

као лако, средње тешко и тешко обољење. Тешка форма акутног панкреатитиса се карактерише ексцесивним системским инфламацијским одговором, мултиорганском дисфункцијом, локалним компликацијама попут некрозе панкреаса и смртним исходом који се развија код 30-40% оболелих. Код већине пацијената се развија лака форма АП, док се код 25% развија тешка форма болести. Механизми који одређују да ли ће настати лака или тешка форма болести још увек нису довољно проучени.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

### *Значај студије*

Значај студије се огледа у томе што би резултати овог истраживања указали на потенцијалну улогу Gal-3 у регулацији апоптозе ацинусних ћелија и модулацији урођеног и стеченог имунског одговора у експерименталном моделу акутног панкреатитиса. Резултати би могли да укажу на евентуалну терапијску примену галектина и њихових блокатора.

### *Циљ студије*

Основни циљ овог истраживања је испитивање улоге Gal-3 у патогенези акутног панкреатитиса.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити утицај недостатка гена за Gal-3 на тежину болести праћењем патохистолошких промена и мерењем вредности амилаза и липаза у серуму.
2. Испитати фенотипске и функционалне разлике у саставу инфилтрата у панкреасу мишева са делецијом гена за Gal-3 и мишева који имају функционални ген за Gal-3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса.
3. Упоредити серумске цитокинске профиле и доминантан имунски одговор (*Th1*, *Th2* и *Th17*) у мишева са делецијом гена за Gal-3 и мишева који имају функционални ген за Gal-3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса.
4. Истражити везу између експресије Gal-3, степена апоптозе ацинусних ћелија и тежине болести.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Галектин-3 је протеин величине 29-35-kDa и по својој структури је јединствен међу члановима фамилије лектина. Gal-3 је првобитно идентификован као *Mac-2*, површински ћелијски маркер експримиран на мишијим перитонеалним макрофагима стимулираних тиогликолатом. У зависности од типа и пролиферативног статуса ћелије, Gal-3 се може наћи у једру, цитоплазми, митохондријама, на површини ћелије, а у секретованом облику се налази и у ткивним течностима. Има улогу у регулацији ћелијске пролиферације, диференцијације и апоптозе. Gal-3 је експримиран на епителним и ендотелним ћелијама, као и на ћелијама имунског система (макрофагима, дендритским ћелијама, еозинофилима, мастоцитима, NK ћелијама, NKT ћелијама, активираним Т и В лимфоцитима). Описана је

про-инфламацијска улога Gal-3 у акутној инфламацији. Након интраперитонеалне инјекције тиогликолата, у Gal-3 дефицијених мишева присутно је мање неутрофила и макрофага, а у ћелијама имунског система мања је активација нуклеарног фактора  $\kappa B$  (енгл. *Nuclear Factor- $\kappa B$* , *NF- $\kappa B$* ) који утиче експресију про-инфламацијских медијатора попут *TNF- $\alpha$*  и *IL-1 $\beta$* . У експерименталном моделу акутног панкреатитиса, показано је смањење апоптозе ацинусних ћелија када прекомерно експримирају Gal-3. Ови налази о функцији Gal-3 могу бити важни за патогенезу акутног панкреатитиса.

Акутни панкреатитис је акутно запаљење панкреаса које настаје услед превремене активације протеолитичких ензима у ткиву панкреаса што узрокује оштећење ацинусних ћелија. Из оштећених ацинусних ћелија се ослобађају молекули који су означени као алармини (нуклеотиди попут *ATP*, *ADP*, *heat shock* протеини, *IL-33*) и узрокују активацију локалних ћелија имунског система и суседних ацинусних ћелија панкреаса. Ове ћелије продукују различите инфламацијске медијаторе и цитокине, попут *TNF- $\alpha$*  (енгл. *Tumor Necrosis Factor*, *TNF- $\alpha$* ), интерлеукина-1 $\beta$  (енгл. *Interleukin -IL-1 $\beta$* ), *IL-6*, *MCP-1* (енгл. *Monocyte Chemotactic Protein*, *MCP-1*), што узрокује активацију и накупљање неутрофила и моноцита. У тешком облику АП, оштећење и инфламација панкреаса узрокује ослобађање инфламацијских медијатора у циркулацију и настанак системске инфламације. Неутрофили су прве ћелије имунског система које инфилтришу оштећено ткиво панкреаса. Активирани неутрофили фагоцитишу некротичне ћелије, продукују супероксидне радикале, протеолитичке ензиме и доприносе даљој активацији трипсиногена. Неутрофили учествују у развоју како локалних компликација болести, попут панкреасне некрозе, тако и системских компликација, односно оштећења плућа. Деплеција циркулишућих неутрофила смањује оштећење панкреаса и степен системског инфламацијског одговора у АП. Потом, оштећено ткиво панкреаса инфилтришу моноцити који се трансформишу у макрофаге. Степен активације макрофага значајно утиче на тежину АП услед продукције различитих цитокина и инфламацијских медијатора што узрокује амплификацију инфламацијског одговора и развој оштећења у органима попут јетре, плућа и бубрега. Ослобађање цитокина у циркулацију узрокује активацију других резидуалних макрофага, попут перитонеалних макрофага, Купферових ћелија и алвеоларних макрофага који имају кључну улогу у прогресији АП ка тешкој форми, с обзиром да продукују про- или анти-инфламацијске цитокине. И друге ћелије имунског система играју значајну улогу у патогенези АП. Активација мастоцита је важан корак за развој мултиорганске дисфункције, с обзиром да ове ћелије продукују медијаторе попут хистамина што узрокује ендотелну дисфункцију у панкреасу и удаљеним органима. Описано је да у АП настаје промена односа  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т лимфоцита у корист  $CD4^+$  Т лимфоцита.  $CD4^+$  Т лимфоцити су укључени у прогресију тока АП услед њихове улоге у активацији макрофага и директних цитотоксичких ефеката на ацинусне ћелије панкреаса које је посредовано експресијом *Fas* лиганда.

## 2.7. Методе истраживања

### Врста студије

У питању је експериментална студија на животињама и анималном материјалу *in vivo* и *in vitro*.

## Експерименталне животиње

Истраживања ће се спровести у складу са одредбама Етичког одбора за добробит лабораторијских животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експериментима.

Користиће се WT и Gal-3<sup>-/-</sup> C57BL/6 мишеви, мушког пола, старости од 8-12 недеља, виваријума Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

## Индукција АП

Акутни панкреатитис ће бити узрокован на следећи начин. Мишеви ће бити анестезирани интраперитонеалном применом кетамина и ксилазина. У асептичним условима креираће се медијална лапаротомија, а затим ће се идентификовати и подвезати билио-панкреатични дуктус у близини споја са дуоденумом. Иста процедура ће се обавити и код *sham-operated* контрола, где ће се само препарисати билио-панкреатични дуктус, без подвезивања. Мишеви ће постоперативно добијати аналгезију трамаолом (20 mg/kg, s.c.).

Животиње ће бити распоређене у следеће експерименталне групе:

E1: Gal-3<sup>-/-</sup> мишеви са узрокованим АП

E2: WT мишеви са узрокованим АП

E3: Gal-3<sup>-/-</sup> мишеви које су *sham-operated* контроле

E4: WT мишеви које су *sham-operated* контроле

## Патохистолошка анализа ткива панкреаса

Мишеви ће се жртвовати цервикалном дислокацијом 3 дана од индукције болести, након чега ће им се изоловати панкреас за патохистолошку анализу. На хистолошким препаратима ће се одређивати оштећење ацинуса и инфилтрација ћелија имунског система на основу патохистолошког скорa.

## Мерење цитокина и вредности амилаза у серуму

Концентрација цитокина (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *IL-10* и *IL-17*) и вредности амилаза и липаза ће се мерити у серуму мишева након 3 дана од индукције, *ELISA* методом према утврђеном протоколу произвођача (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*).

## Изолација ћелија из ткива панкреаса

Након жртвовања из мишева ће се изоловати панкреас. Уситњено и опрано ткиво панкреаса биће дигестирано у раствору 2mg/ml колагеназе тип 5 (*Sigma-Aldrich, St.Louis, USA*) у *Balanced Salt Solution*-у (*HBSS, Sigma-Aldrich, Germany*), са 10% *FCS* на 37°C, 15 минута. Дигестирано ткиво ће механички бити пропуштено кроз 40 $\mu$ m-ско ћелијско сито (*BD Biosciences San Jose, CA, USA*). Након лизирања еритроцита у добијеној суспензији, ћелије ће бити опране два пута и ресуспендоване у *HBSS*-у са 10% *FCS*. На тај начин ће се добити ћелијска суспензија, која ће се користити за проточну цитометрију.

## Анализа фенотипа ћелија изолованих из ткива панкреаса

Изоловане ћелије панкреаса ће бити обележене флуорохром-конјугованим моноклонским анти-мишјим антителима специфичним за мембранске маркере (*CD3, CD4, CD8, CD11c, CD11b, F4/80, CD206, I-A/I-E, CD45, SiglecF, CD80, Ly6G, CD117, FcεRI, NK1.1, CD62L; BD Pharmingen, San Jose, CA*). Коришћењем примарно конјугованих моноклонских анти-мишјих анти-citoкинских антителима (*IL-1, TNF, IL-6, IL-17, IFN-γ, IL-12, IL-4, и IL-10; BD Pharmingen*) за интрацелуларно бојење, одредиће се процентуални удео и укупан број мембрански обележених ћелија које их продукују. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије ће се инкубирати 4 h на 37°C у присуству 5 µg/ml *phorbol 12-myristate 13-acetate-a (PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA)*, 5 µg/ml *ionomycin-a (Sigma-Aldrich St.Louis, USA)* и 0.8µl *Golgi plug (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)*. Након инкубације, ћелије ће се фиксирати и пермеабилитовати употребом *BD Cytofix/Cytoperm kit-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)* и обележити одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима.

### **Изоловање панкреасних ацинусних ћелија и детектовање апоптозе**

Свеже ексцидирано панкреасно ткиво ће се дигестирати у *DMEM* медијуму који садржи колагеназе, 0.25% *BSA*, пеницилин, стрептомицин и инхибитор трипсина. Затим ће се филтрирати кроз 150 µm мрежицу и пречистити линеарним 4% *BSA* градијентом. Након двочасовне еквилибрације, ацинусне ћелије ће се култивисати у плоче са медијумом који садржи *BSA*, инхибитор трипсина, стрептомицин и пеницилин, на температури од 37°C, 95% ваздуху и 5% *CO2*. Након десетодневне култивације овако изолованих ћелија оне ће бити изложене *ionomycin*-у (1 µg/ml) у трајању од 22 сата. Степен апоптотичних ћелија ће бити одређен проточном цитометријом уз помоћ *Annexin V FITC Detection Kit (BD Pharmingen, San Jose, CA)*.

### **Варијабиле које се мере у студији**

**Независне варијабле:** Примарна независна узрочна варијабла је присуство *GAL-3*, које је код *knock-out* мишева на *C57BL/6* подлози, добијено циљаном делецијом гена за *GAL-3*.

**Зависне варијабле:** патохистолошки скор акутног панкреатитиса, серумски нивои цитокина, амилаза, липаза, процетни удео ћелија имунског система у инфилтрату панкреаса и степен апоптозе ацинусних ћелија.

### **Снага студије и величина узорка**

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима хистолошког скору акутног панкреатитиса добијених у прелиминарном експерименту. Средња вредност скору у *Gal3<sup>-/-</sup>* мишева била је  $10,08 \pm 1,60$ , а и *WT* мишева  $8,95 \pm 0,83$ . За израчунавање величине узорка коришћен је двострани независни т-тест, за жељену снагу студије  $1-\beta=0,99$  (99%), вероватноћу грешке I типа ( $\alpha$ ) 0,05 и претпоставку да ће обе групе садржати подједнак број експерименталних животиња. На основу задатих параметара израчунали смо да је неопходно да укупан узорак садржи 120 експерименталних животиња, односно по 30 у свакој групи.

## Статистичка обрада података

За статистичку обраду добијених резултата користиће се комерцијални програмски пакет *SPSS (v.20.0, SRSS Inc., Chicago, IL)*. Подаци ће бити приказани као *Mean ± SE*. За анализу података користиће се параметарски или непараметарски тестови у односу на нормалност расподеле, која ће бити одређена *Kolmogorov-Smirnov* тестом. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износиће  $p < 0.05$ , док ће статистички веома значајна разлика бити  $p < 0.01$ .

### 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да делеција гена за Gal-3 у експерименталном мишјем моделу акутног панкреатитиса интензивира болест, да појача инфламацију и оштећење ткива панкреаса. Овим испитивањем би истражили нове имунопатогенетске механизме акутног панкреатитиса и евентуално указали на нове терапијске мере у лечењу почетне фазе акутног панкреатитиса.

### 2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи Gal-3 дефицијентне мишеве, анализом препарата панкреаса, одређивањем нивоа амилаза, липаза и цитокина у серуму ELISA методом испитаће се утицај Gal-3 на развој експерименталног акутног панкреатитиса. Методом проточне цитометрије ће се анализирати утицај Gal-3 на састав инфилтрата панкреаса, фенотип и цитокински профил моноклеарних ћелија које инфилтришу панкреас. Утврдиће се утицај Gal-3 на апоптозу ацинусних ћелија панкреаса.

## 3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус 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 у вези са темом докторске дисертације:

Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 $\beta$  in Macrophages. *J Crohns Colitis*. 2016 10(5):593-606.

Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep*. 2016 21;6 doi: 10.1038/srep23348.

Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. Mol Med. 2015 22;21:453-65.

Saksida T, Nikolic I, Vujicic M, Nilsson UJ, Leffler H, Lukic ML, Stojanovic I, Stosic-Grujicic S. Galectin-3 deficiency protects pancreatic islet cells from cytokine-triggered apoptosis in vitro. J Cell Physiol. 2013 228(7):1568-76.

#### 4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална хирургија

#### 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 ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан
3. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
4. **Проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. **Проф. др Јасна Јевђић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

#### Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Бојана Стојановића, комисија закључује да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. 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 испита улогу галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Бојана Стојановића бити од великог научног и практичног значаја у смислу истраживања нових имунопатогенетских механизма акутног панкреатитиса који одређују тежину акутног панкреатитиса.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Бојана Стојановића „**Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса**“ и одобри њену израду.



ЧЛАНОВИ 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 ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан

---

3. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

---

4. **Проф. др Драган Чановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

---

5. **Проф. др Јасна Јевђић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

---

У Крагујевцу, 23.06.2016.