

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО- НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-6102/3-7, од 08.06.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Бојане Стојановић, под називом:

„Утицај галектина 3 на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, 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

Бојана Стојановић, рођена 12. 04. 1988. године у Призрену. Основну школу и Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршила је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уписала је школске 2006/07. године, и дипломирала је 2012. године, са просечном оценом 9,51 (девет и 51/100) и тиме стекла звање доктор медицине. Након завршених студија, обавила је обавезан лекарски стаж и положила стручни испит за доктора медицине у априлу 2013. године. Докторске академске студије, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација уписала је школске 2012/13. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Положила је усмени докторски испит 31.07.2014 са оценом 10 (десет). Од 06.12.2013 године, запошљена је на Факултету медицинских наука као сарадник у настави за ужу научну област Патолошка физиологија. Од 07.04.2016 године, изабрана у звање асистента за ужу научну област Патолошка физиологија. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару. Активно учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија у оквиру два макро пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу:

1. МП 01-14 „Галектин 3, IL-33R и инфекције у имунопатогенези инфламаторних

- болести“
2. МП 02-14 „Испитивање цитотоксичног дејства биоактивних супстанци и имуномодулација тумора“

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Утицај галектина 3 на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом“

Предмет: Утврђивање улоге Gal-3 у развоју инфламације изазване вирусом и неуроинфламације изазване удруженим ефектом инфекције *Cytomegalovirus*-ом и имунизације антигеном мијелина.

Хипотеза: Одсуство Gal-3 супримира имунски одговор на вирус и повећава неуроинфламацију и оштећење ткива изазвано аутоантигеном.

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:

Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Miodrag L. Lukic. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17 (2): 87- 91
M52

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Мултипла склероза (МС) је хронична инфламацијска, демиелинизирајућа болест централног нервног система (ЦНС) коју карактеришу запаљењске лезије, демиелинизација, губитак аксона, а одликује се различитим клиничким током, патолохистолошким и запаљенским обрасцима. Развија се код особа са генетском предиспозицијом, након интеракције са факторима окружења, који подстичу развој болести промовисањем активације Т лимфоцита специфичних за мијелин који нормално рециркулишу у периферним лимфним органима. Сматра се да је инфекција најважнији фактор животне средине која има узрочну улогу у патогенези мултипле склерозе. Међу различитим инфективним агенсима, *Epstein-Barr* вирус (EBV), је удружен са повећаним ризиком од настанка МС. EBV инфекција поларизује стечени имунски одговор и појачава имунопатолошке механизме у ЦНС-у у експерименталним моделима МС

Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ) је модел за проучавање мултипле склерозе, који се индукује код осетљивих животиња активном имунизацијом мијелинским антигенима и адјувансом. ЕАЕ се веома дуго користи као модел за проучавање учешћа појединих компоненти имунског система у развоју аутоимунског процеса у ЦНС-у. Т лимфоцити активирани енцефалотигеном на периферији диференцирају у инфламацијске помагачке Т лимфоците који су способни да прођу крвно-мождану баријеру, где препознају сродне циљне антигене и иницирају инфламацијску каскаду која изазива оштећење ткива. ЕАЕ такође може бити индукован пасивним

трансфером популације помагачких Т лимфоцита, који су специфични за антигене мијелина.

Галектин-3 припада групи убиквитарних лектина и најпре је идентификован као површински антиген кога испољавају перитонеални макрофаги мишева под утицајем тиогликолата и зато се означава и као Мас-2. Овај лектин се експримира на епителним и ендотелним ћелијама, као и на ћелијама имунског система (макрофагима, дендритским ћелијама, НК ћелијама, НКТ ћелијама). Описана је улога Gal-3 у патогенези канцера и аутоимунских болести посредованих аутореактивним клоновима Т лимфоцита.

Cytomegalovirus (CMV), који је сврстан у субфамилију *Betaherpesvirinae*, је специфичан херпес вирус који успоставља доживотну латентну инфекцију код домаћина. CMV вирион садржи двоструки ДНК вирусни геном, чије латентне и литичке врсте гена кодирају око 230-250 протеина, од којих многи имају имуно-регулаторне улоге. CMV инфицира различите ћелије, укључујући фибробласте, епителне, ендотелне ћелије, и глатко мишићне ћелије. CMV перзистира у мијелоидним прогениторским ћелијама и моноцитима. Када ове ћелије уђу у висцерални паренхим и диферентују се у макрофаге или мијелоидне дендритске ћелије, латентни вирус се реактивира и стимулише продукцију проинфламацијских медијатора који подстичу активацију Т лимфоцита и на тај начин модулише имунски одговор домаћина.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај студије се огледа у томе што би резултати овог истраживања указали на улогу Gal-3 у развоју инфламације изазване вирусом и неуроинфламације изазване удруженим ефектом инфекције *Cytomegalovirus*-ом и имунизације антигеном мијелина.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је да се утврди удружена улога галектина-3 у патогенези инфламације изазване инфекцијом *Cytomegalovirus*-ом и у патогенези ЕАЕ који је индукован код претходно вирусом инфицираних мишева коришћењем Gal-3 позитивних C57BL/6 мишева, осетљивих на индукцију ЕАЕ и Gal-3 дефицијентних мишева, делимично резистентних на индукцију ЕАЕ пептидом MOG₃₅₋₅₅.

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

- На основу процене клиничке слике и хистолошке анализе ткива мозга и кичмене мождине утврдити утицај инфекције *Cytomegalovirus*-ом на развој ЕАЕ код C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева
- Испитати ефекат инфекције *Cytomegalovirus*-ом на целуларност инфилтрата у централном нервном систему и фенотип инфилтришућих ћелија код C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева
- Испитати ефекат инфекције *Cytomegalovirus*-ом на целуларност инфилтрата у централном нервном систему и фенотип инфилтришућих ћелија код C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом

- Утврдити допринос CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита у развоју болести изазване инфекцијом *Cytomegalovirus*-ом и имунизацијом аутоантигеном код C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева.
- Упоредити цитокинске профиле лимфоцита изолованих из ЦНС-а C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом и имунизованих аутоантигеном.
- Испитати специфичност лимфоцита у инфилтратима ЦНС-а C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом и имунизованих аутоантигеном.
- Упоредити фенотип и функционалне карактеристике микроглије C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом
- Упоредити фенотип и функционалне карактеристике микроглије C57BL/6 WT и Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ) је показано да галектин-3 дефицијентни мишеви развијају знатно блажи облик болести у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима, што је праћено мањом инфилтрацијом моноцита и макрофага у централни нервни систем и повећаном апоптозом ћелија у инфилтрату, дакле Gal-3 дефицијентни мишеви су делимично резистентни на индукцију ЕАЕ енцефалитогеним пептидом, мијелин олигодендроцитним гликопротеином (MOG₃₅₋₅₅). Ови резултати су поткрепљени запажањем да галектин-3 промовише проинфламацијску каскаду сигналних путева у мозгу. Скорија истраживања указују да деплеција Gal-3 има неуропротективни и антиинфламацијски ефекат у моделу неуроинфламације индуковане липополисахаридом и енцефаломијелитиса изазваног вирусом *Theiler's murine encephalomyelitis*. Међутим, описани су и супротни, проинфламацијски, ефекти Gal-3 и то у моделу фокалне моздане исхемије и амиотрофичне латералне склерозе.

Постоје контроверзни подаци о улози инфекције CMV-ом у етиопатогенези MS. CMV је пронађен у плаковима демиелинизације и цереброспиналној течности оболелих од MS и може код имунодефицијентних особа да индукује демиелинизацију. Неколико студија на људима указује на корелацију између CMV инфекције и развоја MS, на већу стопу релапса и израженију атрофију мозга. Друге студије указују на протективну улогу инфекције CMV-ом на развој аутоимунске неуропатологије.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

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

Експерименталне животиње

Користиће се мишеви соја C57BL/6 (*wild type*, WT) и Gal-3^{-/-} дефицијентни мишеви на C57BL/6 основи, женског пола, старости од 8 до 10 недеља. Све планиране процедуре

одобрила је Етичка комисија за рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Инфекција вирусом и индукција ЕАЕ

Мишеви ће бити инфицирани применом 10^5 PFU мишјег соја CMV, интраперитонеално. Десет дана после инфекције вирусом мишеви ће бити имунизовани субкутаном применом MOG₃₅₋₅₅ пептида (300 µg) раствореног у 100 µL PBS-а помешаног са 100 µl комплетног Фројндовога адјуванса (CFA) са додатком *M. Tuberculosis*, тако да садржи укупно 800 µg бактерије. Мишеви ће првог и трећег дана индукције примити интраперитонеалну инјекцију пертусус токсина (300 ng у 100 µl NaCL-а).

Праћење клиничког тока ЕАЕ

Испољавање болести ће се пратити и оцењивати свакодневно на основу следећих критеријума: 0- нема клиничког испољавања болести; 0.5- парцијална парализа репа; 1- парализа репа; 2- атаксија или пареза задњих екстремитета; 2,5- једна задња нога парализована; 3- обе задње ноге парализоване; 3,5- парализа задњих ногу и пареза предњих ногу, или парализа 3 екстремитета; 4- парализа сва 4 екстремитета; 5- смрт и изражаваће се у виду средњег клиничког скорa.

Хистолошка анализа

Након жртвовања мишева, направиће се парафински исечци мозга и кичмене мождине. Препарати обојени хематоксилином и еозином служиће за одређивање степена инфилтрације нервног ткива. Користиће се следећи критеријум за процену инфилтрације: 0- нема инфилтришућих ћелија; 1- неколико појединачних инфламацијских ћелија; 2- организовани периваскуларни инфилтрати; 3- периваскуларна инфилтрација са ширењем у субарахноидни простор и паренхим CNS-а; 4- изражена субарахноидна и паренхимска инфилтрација.

Имунохистохемијске анализе

Депарафинисани исечци ће се инкубирати са зечјим моноклонским антителима за мишји Gal-3. Везана антитела се визуализују помоћу конјугата специфичног за зечја антитела (*Expose Rb-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) и фотомикрографисањем помоћу дигиталне камере повезане са светлосним микроскопом (*Olympus BX51*).

Изолација моноклеарних ћелија из CNS-а

Након жртвовања мишева екстирпираће се ткиво мозга и кичмене мождине. Моноклеарне ћелије из нервног ткива ће бити изоловане на градијенту перкола према протоколу.

Фенотипизација изолованих моноклеарних ћелија централног нервног система

Моноклеарне ћелије ће бити регистроване помоћу моноклонских антитела (обележених флуоресцентним бојама) специфичних за: CD3, CD4, CD8, CD45, CD11b, F4/80, CD11c,

CD86, CD206, перфорин, гранзим B, IL-17, IFN- γ (BD *Biosciences*). За интрацелуларну детекцију цитокина ћелије ће бити стимулисане са РМА и јономицином, затим ће бити фиксирани и пермеабелизовани коришћењем *Cytofix/Cytoperm* кита пре бојења са анти-цитокинским антителима. Обележене ћелије ће бити анализирани помоћу проточног цитометра FACSCalibur (BD *Biosciences*), а анализа обављена коришћењем програма *FlowJo (Tree Star)*.

IFN- γ есеј (одређивање специфичности лимфоцита)

Мононуклеарне ћелије изоловане из CNS-а (10^5 у $100 \mu\text{L}$ комплетног медијума по отвору микротитар плоче) *in vitro* ће се стимулирати пептидом MOG₃₅₋₅₅ ($1 \mu\text{g/well}$) или вирусним пептидом. Након једночасовне инкубације са пептидима на 37°C ћелијама ће се додати $0,2 \mu\text{L}$ брэфелдина А и наставиће се инкубација на 37°C још 4 сата. Ћелије ће се након истека инкубације бојити анти-CD8 и анти-CD4 антителима. Након прања, ћелије ће се фиксирати и пермеабелизовати у пуферу *Cytofix/Cytoperm* и инкубирати са анти-IFN- γ антителима 30 минута, након чега ће се детектовати проценат CD4+IFN- γ + и CD8+IFN- γ + ћелија.

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: клинички и патохистолошки скор експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса, серумски нивои цитокина, процентни удео ћелија имунског система у инфилтрату централног нервног система.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о проценту мононуклеарних ћелија које продукују IFN- γ добијених у прелиминарном експерименту. Средња вредност процента мононуклеарних ћелија које продукују IFN- γ у Gal 3-/- мишева била је $1,55 \pm 0,62$, а и WT мишева $1,02 \pm 0,43$. За израчунавање величине узорка користили смо двострани независни т-тест, жељену снагу студије $1-\beta=0,95$ (95%), вероватноћу грешке I типа (α) 0,05 и претпоставку да ће обе групе садржати подједнак број експерименталних животиња. 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 50 за сваку од група.

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 18. Пре статистичке обраде података, испитаће се правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користимо параметарски Student-ов t тест, док ће се

неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). 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

Очекује се да инфекција Gal-3^{-/-} дефицијентних мишева *Cytomegalovirus*-ом омогућити развој ЕАЕ, након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ тј да ће Gal-3 имати протективни ефекат у неуроинфламацији изазваној удруженим ефектом вирусне инфекције и стимулације енцефалитогеном. Ова студија ће по први пут указати на значај инфекције *Cytomegalovirus*-ом и Gal-3 у патогенези ЕАЕ што би могло да утиче на креирање нових терапеутика за МС.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Коришћењем Gal-3 позитивних и Gal-3 C57BL/6 дефицијентних мишева, утврдиће се улога Gal-3 у патогенези CMV инфекције и ЕАЕ-а. Пратиће се испољавање болести као и карактеристике инфилтрата у CNS-у. У инфилтратима у CNS-у анализираће се функционални фенотип CD4+T и CD8+T лимфоцита са посебним испитивањем значаја CD8+T лимфоцита за развој болести код Gal-3 позитивних и Gal-3 C57BL/6 дефицијентних мишева претходно инфицираних вирусом.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. 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; 6:23348. doi: 10.1038/srep23348.
2. Milovanovic M, Volarevic V, Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. *Plos ONE* 2012;7(9):e45225.
3. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Linington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY. IL - 33 attenuates EAE by

suppressing IL- 17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. Eur J Immunol 2012; 42(7):1804- 1814.

4. G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, D.K. Hsu, M.L. Lukic. The roles of Galectin- 3 in autoimmunity and tumor progression. Immunol Res 2012; 52(1- 2):100- 110

5. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin- 3 deficiency prevents concanavalin A - induced hepatitis in mice. Hepatology 2012; 55(6):1954-1964.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Имунологија, инфекција и инфламација

5. 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 Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

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

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Бојане Стојановић, 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 утицај галектина 3 на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Бојане Стојановић бити од великог научног и практичног значаја у смислу истраживања нових имунопатогенетских механизма.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Бојане Стојановић уз корекцију наслова који сада гласи „Утицај галектина 3 на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан

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

У Крагујевцу, 23.06. 2016.