

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-929/13 од 04.10.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Далибора Стајића под називом: „Утицај галектина-3 на настанак бихевиоралних промена у базичним условима и током неуроинфламације“.

Чланови комисије су:

1. **Академик Проф. др Душица Лечић-Тошевски**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Психијатрија*, председник;
2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;
3. **Проф. др Нела Ђоновић**, ванредни професор Медицинског Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хигијена и екологија*, 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

Др Далибор Стајић, је рођен 19.08.1985. године у Врању, Република Србија. Основну школу и средњу Медицинску школу је завршио у Врању са одличним успехом. Медицински факултет у Крагујевцу уписао је школске 2004/2005. године, а звање доктора медицине стекао је 09.07.2010. године са просечном оценом 9.29. Након завршених студија обавио је обавезан приправнички стаж и положио стручни испит 2011. године. Од 1. јула 2013. до 30. јуна 2014. године био је ангажован у Дому здравља Крагујевац, на пројекту Министарства здравља „Пружање унапређених услуга на локалном нивоу – DILS“. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је школске 2014/2015. године – изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Све испите предвиђене планом и програмом студија положио је са просечном оценом 9.83. Усмени докторски испит положио је у априлу 2017. године са оценом 10. Специјалистичке студије из Хигијене уписао је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу децембра школске 2015/2016. године. За сарадника у настави за ужу научну област Хигијена и екологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу изабран је 18. 12. 2014. године. Децембра 2016. изабран је у звање асистента за ужу научну област Хигијена и екологија. У изборном периоду активно је учествовао у извођењу наставе на предмету Исхрана у здрављу и болести, Нутритивни суплементи, Хигијена и екологија, Примарна здравствена заштита, Хигијена и епидемиологија, Геријатрија са негом, Историја стоматологије и Народно здравље у оквиру студијских програма: Интегрисане академске студије медицине, Интегрисане академске студије фармације, Интегрисане академске студије стоматологије и Основне струковне студије. Руководилац је интерног-јуниор пројекта Факултета медицинских наука евиде. бр. ЈП 07/17 под називом „Утицај галектина-3 на настанак бихевиоралних промена у базичним условима и током неуроинфламације“.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Утицај галектина-3 на настанак бихевиоралних промена у базичним условима и током неуроинфламације“

Предмет: Испитивање утицаја галектина-3 на настанак промена понашања у базичним условима и током неуроинфламације индуковане интраперитонеалним применом липополисахарида.

Хипотезе студије су:

Хипотеза 1: Делеција галектина-3 (енгл. *galectin-3*, Gal-3) атенуира неуроинфламацију и последичне промене у понашању.

Хипотеза 2: Бихевиоралне промене су повезане са променама експресије Gal-3 и рецептора γ -аминобутерне киселине А (енгл. γ -Aminobutyric acid, GABA-A);

Хипотеза 3: Бихевиоралне промене су повезане са променама концентрације неуромедијатора GABA, неуротрофног можданог фактора (енгл. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), као и односа проинфламацијских и регулаторних цитокина.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је као први аутор објавио један рад у целини у часопису категорије M51 на једном од водећих светских језика, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Stajic D, Zivanovic S, Miric A, Sekulic M, Djonovic N. Prevalence of risk factors among women with osteoporosis. *Ser J Exp Clin Res* 2017 DOI:10.1515/SJECR-2016-0080. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Gal-3 је члан фамилије лектина који се високим афинитетом везује за β -галактозиде. Gal-3 може имати различите, некада и супротне функције, у зависности од локализације и патогенезе поремећаја. Овај лектин учествује у ћелијској активацији, пролиферацији, диференцијацији, адхезији, миграцији, апоптози, фагоцитози и регулацији инфламације. Gal-3 функционише као рецептор који препознаје молекулске обрасце на површини микроорганизама, активира фагоците и појачава њихову микробицидну способност, подстичући инфламацију.

Gal-3 се експримира у нервним ткивима, укључујући мозак, кичмену мождину и дорзалне ганглије (енгл. *dorsal root ganglia*, DRG). Gal-3 експримирају активирани ћелије микроглије, субпопулације DRG неурона и Шванове ћелије након повреде нерва. Модулацијом својстава екстрацелуларног матрикса, Gal-3 подстиче адхезију нервних ћелија и раст неурита. У нормалном мозгу, Gal-3 експримирају епендималне ћелије и астроцити субвентрикуларне зоне, а има улогу у регулацији миграције неурона.

Кључну улогу у имунском одговору централног нервног система (ЦНС) има микроглија. На присуство инфламацијских стимулуса (LPS-а) микроглија секретује Gal-3 (ендогени лиганд за *Toll-like* рецептор 4), чиме узрокује активацију проинфламацијског M1 фенотипа микроглије. Gal-3 има улогу у активацији микроглије, индукованој α -synuclein-ом код Паркинсонове болести. Gal-3 доприноси развоју болести у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису (EAE). Експресија Gal-3 на активираним макрофагима и микроглији је повезана са акумулацијом измењених протеина код прионских болести. С друге стране, Gal-3 има заштитну, антиинфламацијску улогу у амиотрофичној латералној склерози. Gal-3 има битну улогу и у процесу ремоделовања можданог ткива након исхемијског оштећења, тако што подстиче ангиогенезу и неурогенезу. Проинфламацијски цитокини микроглије (TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-12 IFN- γ) директно делују на неуротрансмисију и могу утицати на промене у понашању, а примена LPS-а код мишева узрокује понашање слично депресији и анксиозности.

2.5. Значај и циљ истраживања

По први пут би се истовремено испитивала корелација између делеције Gal-3, концентрације и експресије рецептора неуротрансмитера и неуротрофних фактора одговорних за контролу понашања мишева, концентрације проинфламацијских и регулаторних цитокина у хипокампусу и промена у понашању. Резултати овог истраживања могли би указати на могућност да Gal-3 учествује у регулацији појединих образаца понашања у базичним условима, као и током неуроинфламације. Указало би се на могућност третирања бихевиоралних поремећаја узрокованих неуроинфламацијом, применом фармаколошких и биолошких модулатора нивоа Gal-3.

Основни циљ ове студије је испитивање утицаја делеције Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова *wild-type* (енгл. *wild-type*, WT) и Gal-3 *knockout* (енгл. *Knockout*, КО, Gal-3^{-/-}) мишева соја C57BL/6 у две старосне групе (8 и 20 недеља). У складу са овим поставили смо следеће задатке:

- Испитивање ефекта старења и Gal-3 делеције у базичним условима, док ће се 24 h и 7 недеља након индукције инфламације LPS-ом утврдити ефекат старења, инфламације и Gal-3 делеције на промене понашања;
- Одређивање релевантних параметара неуроинфламације и бихевиоралних поремећаја у можданом ткиву (хипокампусу) и крви.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Gal-3 пореклом из микроглије стимулише диференцијацију олигодендроцита, доприноси процесу мијелинизације и игра важну улогу у побољшању инфламацијских поремећаја праћених демиелинизацијом. При повреди нерава и Валеријановој дегенерацији, Gal-3 помаже макрофагима у фагоцитози дегенерисаног мијелина. Међутим, експерименти су показали да Gal-3 инхибира пролиферацију Шванових ћелија у културама исхијадичног нерва. У студијама које су испитивале регенерацију исхијадичног нерва код Gal-3^{-/-} мишева уочен је повећан број макрофага и Шванових ћелија, убрзана регенерација нерва и бржи опоравак локомоторне функције.

Промене у структури мијелина код Gal-3^{-/-} мишева могу изазвати одређене промене у понашању. Ова претпоставка је потврђена резултатима истраживања спроведеног на Gal-3^{-/-} и одговарајућим WT мишевима старости 9-13 недеља. У студији *Hoynos et al.* (2014), Gal-3^{-/-} и WT мишеви старости 8 недеља третирани су купризоном током 2 недеље, у циљу индукције демиелинизације. Резултати су показали да мишеви третирани купризоном имају нижи ниво анксиозности у поређењу са одговарајућим наивним мишевима.

Истраживања указују на то да на настанак анксиозних поремећаја и депресије утиче и дефицит главног инхибиторног неуротрансмитера, GABA. Неке студије указују на везу између Gal-3 и BDNF-а. BDNF је неуротрофин који учествује у опстанку, пролиферацији и диференцијацији неурона. *In vitro* експерименти су доказали да присуство BDNF-а повећава експресију Gal-3 у DRG неуронима. Истраживања показују да су смањени нивои BDNF-а повезани са анксиозни поремећајима и депресијом.

2.7. Методе истраживања

2.7.1 Врста студије

Истраживање је осмишљено као експериментална студија на животињама *in vivo* и на материјалу *in vitro*.

2.7.2. Експерименталне животиње

Планирано је да се за истраживање користи укупно 96 мишева (48 WT и 48 Gal-3^{-/-}) соја C57BL/6, мушког пола. Код мишева старости 8 недеља и 20 недеља радиће се тестови понашања и анализе у базичним условима и у акутној неуроинфламацији 24 часа након апликације LPS-а. Опоравак и одложени ефекти неуроинфламације испитиваће се 7 недеља након примене LPS-а.

У експерименту би се користиле животиње виваријума Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Животињама би била доступна вода и храна у довољној количини (*ad libitum*).

Неуроинфламација би била индукована применом LPS-а (*Sigma, St, Louis, MO*) интраперитонеално, у једној дози од 5 mg/kg, док би се у свим осталим групама апликовала иста количина физиолошког раствора интраперитонеално.

Студија би се спроводила према принципима Добре лабораторијске праксе и одговарајуће директиве ЕУ (2010/63/EU), уз сагласност надлежног Етичког одбора. Предвиђено је да истраживање траје две године.

2.7.3. Узорковање

Јединке ће се методом случајног узорка одвајати у кавезе по групама, тако да ће бити формирано 12 огледних група (по 8 мишева).

Експерименталне групе су:

1. WT C57BL/6 старости 8 недеља - апликује се физиолошки раствор и тестови раде након 24 сата;
2. Gal-3 KO старости 8 недеља - апликује се физиолошки раствор и тестови раде након 24 сата;
3. WT C57BL/6 старости 20 недеља - апликује се физиолошки раствор и тестови раде након 24 сата;
4. Gal-3 KO старости 20 недеља - апликује се физиолошки раствор и тестови раде након 24 сата;
5. WT C57BL/6 старости 8 недеља - апликује се LPS и тестови раде након 24 сата (акутна неуроинфламација);
6. Gal-3 KO старости 8 недеља - апликује се LPS и тестови раде након 24 сата (акутна неуроинфламација);
7. WT C57BL/6 старости 20 недеља - апликује се LPS и тестови раде након 24 сата (акутна неуроинфламација);
8. Gal-3 KO старости 20 недеља - апликује се LPS и тестови раде након 24 сата (акутна неуроинфламација);
9. C57BL/6 старости 15 недеља - апликује се LPS у 8. недељи и тестови раде након 7 недеља (одложене промене и опоравак);
10. Gal-3 KO старости 15 недеља - апликује се LPS у 8. недељи и тестови раде након 7 недеља (одложене промене и опоравак);
11. C57BL/6 старости 27 недеља - апликује се LPS у 20. недељи и тестови раде након 7 недеља (одложене промене и опоравак);
12. Gal-3 KO старости 27 недеља - апликује се LPS у 20. недељи и тестови раде након 7 недеља (одложене промене и опоравак);

Одмах након тестова понашања животиње би биле жртвоване, издвојило би се ткиво мозга (хипокампус) и серум из крви и узорци би се ставили на дубоко замрзавање до извођења анализа.

2.7.4. Евалуација параметара тестова понашања, експресије Gal-3, рецептора GABA-A, нивоа неуромедијатора GABA и неуротрофног фактора BDNF-а и цитокина

1. Стандардни анимални бихевиорални тестови:

а) Тест отвореног поља (енгл. *Open field*) – процена стања анксиозности:

- учесталост улазака и укупног времена боравка у централној зони,
- укупни пређени пут, средња брзина кретања и укупно време кретања животиње,
- усправљање (енгл. *rearing*) и тимарење (енгл. *grooming*).

б) Тест уздигнутог крстастог лавиринта (енгл. *Elevated plus maze*) – селективнија процена стања анксиозности:

- кумулативно трајање боравка у отвореним крацима и учесталост улазака у отворене краке,
- укупни пређени пут, средња брзина кретања и укупно време кретања животиње,
- нагињање преко ивице отворених кракова (енгл. *head-dipping*) и усправљање на задње ноге (енгл. *rearing*).

в) Тест качења о реп (енгл. *tail suspension test*) – процена депресивности:

- време протекло до појаве прве имобилности
- број епизода имобилности,
- укупно трајање имобилности
- просечног трајања епизоде имобилности.

Тестови за одређивање анксиозности ће трајати 5 минута, а за одређивање депресивност 6 минута. Понашање ће бити регистровано камером. За анализу видео записа користиће се софтвер *EthoVision XT Base, Noldus Information Technology*.

2. Вредности цитокина, неуромедијатора и неуротрофичких фактора:

1. BDNF и цитокини (TNF- α , IFN- γ , IL1- β , IL-6, IL-12, IL-10, TGF- β и IL-17) - одређиваће се у крви ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*);

2. Експресија GABA-A рецептора у хипокампусу - одређиваће се методом RT-PCR;

3. Неуромедијатор GABA и неуротрофни фактор BDNF- одређиваће се у хипокампусу ELISA методом.

2.7.5. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: експресија Gal-3.

Зависне варијабле: параметри тестова понашања, експресија рецептора GABA-A, нивои неуромедијатора GABA, неуротрофног фактора BDNF-а и цитокина.

Не очекује се појава збуњујућих варијабли.

2.7.6. Снага студије и величина узорка

Пројекција узорка је изведена на основу вредности кумулативног боравка у отвореним крацима уздигнутог крстастог лавиринта (код Gal-3^{-/-} и C57BL/6 мишева и мишева одговарајуће контролне групе (WT C57BL/6) старости 20 недеља, 24 сата од апликације LPS-а). Средња вредност величине овог параметра у нашем прелиминарном експерименту у контролној групи је била 78.07 \pm 8.49 секунди, док је у групи Gal-3^{-/-} мишева ова вредности износила 39.19 \pm 7.05 секунди. Коришћењем статистичког програма *G*Power3* ($\alpha=0.05$, снага студије 0.8 за независни t-тест), израчунато је да је потребно 5 експерименталних животиња за сваку групу. Наведени број животиња је повећан на 8 у свакој експерименталној групи, због могућег губитка одређеног броја животиња код анализа одложених ефеката индуковане инфламације (7 недеља од примене LPS-а).

Имајући у виду да ће у истраживању бити испитивано 12 група, утврђено је да укупни узорак чини 96 експерименталних животиња.

2.7.7. Статистичка анализа

Подаци ће се обрадити помоћу програма SPSS 20.0. Биће коришћени одговарајући тестови: анализа варијансе (*ANOVA*) и независни *T* тест за обележја са нормалном расподелом, као и *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови за непараметарска обележја. Статистичка значајност је одређена на $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

На основу резултата претходних студија и наших прелиминарних истраживања, очекује се да ће у базичним условима делеција Gal-3 утицати на настанак промена у понашању. С обзиром да Gal-3 поспешује неуроинфламацију, очекује се да ће, након индуковања неуроинфламације, код WT животиња настати израженије промене у понашању у односу на Gal-3^{-/-} животиње. Такође, очекује се да ће старост животиња утицати на интензитет промена у понашању током акутне неуроинфламације, као и на интензитет промена у понашању током опоравка од инфламације.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Овим истраживањем испитаће се утицаја Gal-3 на настанак промена понашања у базичним условима и током неуроинфламације индуковане липополисахаридом. Разлике у понашању ће бити евалуиране бихевиоралним тестовима који ће се спровести над WT и Gal-3^{-/-} C57BL/6 мишевима, старости 8 и 20 недеља, у базичним условима, као и 24 сата и 7 недеља након интраперитонеалне апликације LPS-а (у једној дози, 5 mg/kg). Одмах након тога, животиње ће се жртвовати и одређиваће се ниво експресије Gal-3, BDNF-а, GABA-A рецептора и концентрација GABA у мозгу (хипокампусу) и концентрација проинфламацијских и регулаторних цитокина у крви.

3. Предлог ментора

Комисија предлаже за коменторе ове дисертације проф. др Миодрага Лукића, професора емеритуса Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и проф. др Гвоздена Росића, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

Предложени наставници испуњавају 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 проф. др Миодрага Лукића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fukada SY, Liu FT, Liew FY, and Lukic ML. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009; 182(2): 1167-1173.
2. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res.* 2012; 52(1-2): 100-110.

3. Pejnovic N, Jeftic I, Jovicic N, Arsenijevic N, **Lukic ML**. Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*. 2016; 22(44): 9706-1
4. 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.
5. 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. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL- β in macrophages. *J Crohns Colitis*. 2016; 10(5): 593-606.

Радови проф. др Гвоздена Росића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Obradovic Z, Pantovic S, **Rosic G**, Selakovic Z, Rosic M. The new experimental model for behavioral investigations in animal studies. *Gen Physiol Biophys*. 2009; 28: 77-86.
2. Joksimovic J, Selakovic D, Matovic M, Zaletel I, Puskas N, **Rosic G**. The role of neuropeptide-Y in nandrolone decanoate-induced attenuation of antidepressant effect of exercise. *PLoS ONE*. 2017; 12(6): e0178922.
3. Selakovic D, Joksimovic J, Obradovic D, Milovanovic D, Djuric M, **Rosic G**. The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-enanthate (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test - indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for exploratory activity estimation in EPM. *Neuroendocrinology letters*. 2016; 37 (5): 383-388.
4. **Rosic G**, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. *Neuroendocrinology letters*. 2014; 35 (8): 703-710.
5. Joksimovic J, Selakovic D, Jakovljevic V, Mihailovic V, Katanic J, Boroja T, **Rosic G**. Alterations of the oxidative status in rat hippocampus and antidepressant effect of chronic testosterone enanthate administration. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017; 433 (1-2): 41-50.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа научна област - Хигијена.

5. Научна област чланова комисије

- Академик Проф. др Душица Лечић-Тошевски, редовни професор медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Психијатрија*, председник;
- Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;
- Проф. др Нела Ђонових, ванредни професор Медицинског Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хигијена и екологија*, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат **др Далибор Стајић** испуњава све услове прописане Статутом факултета и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Комисија је утврдила да се ради о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај галектина-3 на настанак промена понашања у базичним условима и током неуроинфламације индуковане липополисахаридом. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

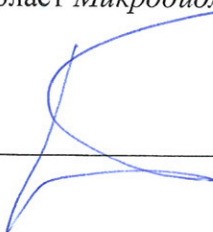
Комисија предлаже Наставно – научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата **др Далибора Стајића**: „Утицај галектина-3 на настанак бихевиоралних промена у базичним условима и током неуроинфламације“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

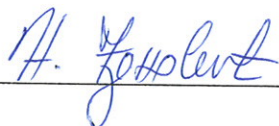
-Академик Проф. др Душица Лечић-Тошевски, редовни професор медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Психијатрија*, председник;



- Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;



- Проф. др Нела Ђоновић, ванредни професор Медицинског Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хигијена и екологија*, члан;



У Крагујевцу, 04.10.2017. године