

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО:	18.10.2019.
Ср. јед.	
05	12384-1

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-716/46, од 16.09.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Александра Арсенијевића, под називом:

"Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома"

Чланови комисије су:

1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни 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 Факултета медицинских наука следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Александар Арсенијевић је рођен 30.11.1986. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршио у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу уписао 2005/2006. и успешно завршио 2012. године са просечном оценом 9,65. Активно се бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. У мају 2013. године учествовао је у мултидисциплинарној школи „5th Course on Cytoskeleton: Cytoskeleton in Cell Organization“ на Институту Кири у Паризу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: "Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома"

Предмет: Испитивање улоге галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом C57BL/6 мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

Хипотеза: Одсуство галектина-3 (Gal-3) и примена инхибитора Gal-3 смањују активацију инфламазома изазвану бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, атенуирају примарни билијарни холангитис (енгл. *Primary Biliary Cholangitis*, PBC) и смањују фиброзу јетре.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат др Александар Арсенијевић је до сада публиковао 1 рад у часопису категорије M21a, 14 радова категорије M21, 6 радова M22 и 5 радова категорије M23. У раду категорије M21, кандидат је први аутор чиме испуњава услов за пријаву теме докторске дисертације:

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. M21; IF=5,228 (2015)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Примарни билијарни холангитис је хронична болест у чијој су патогенези за деструкцију малих интрахепатичних жучних путева одговорни имунски механизми. За разлику од многих других аутоимунских болести у PBC је познат имунодоминантни аутоантиген- PDC-E2 исказан у холангиоцитима интрахепатичних жучних каналића. Сматра се да централно место у патогенези болести припада CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцитима специфичним за имунодоминантне компоненте аутоантигена PDC-E2 присутног у холангиоцитима интрахепатичних жучних каналића, међутим и компоненте урођене имуности играју различите и важне улоге у свим фазама болести.

Галектин-3 (Gal-3) је гликопротеин присутан како у ћелијама тако и на ћелијској мембрани и у екстраћелијским течностима. Овај мултифункционални молекул игра различите и често бидирекционе улоге у различитим физиолошким и патолошким

процесима. На различите начине учествује у регулацији круцијалних механизмима модулације инфламацијских и имунских реакција као што су: стабилизација органела; трансдукција сигнала; контрола ћелијске смрти; адхеренција; препознавање микроорганизама; активација, диференцијација и миграција лимфоцита и многе друге. У зависности од механизма који доминира у патогенези болести, Gal-3 може да има супротне ефекте на развој аутоимунског процеса. Показани су супротни ефекти галектина-3 и у различитим фазама једне исте болести. Gal-3 инхибира апоптозу, тако смањује ослобађање аутоантигена и атенуира системски еритемски лупус (од енг. *Systemic Lupus Erythematosus*, SLE), али исто тако може да повећа продукцију интерферона тип 1 и тако појача аутоимунску реакцију у SLE.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Планираним истраживањем РВС изазваног инфекцијом *N. aromaticivorans* код Gal-3^{-/-} мишева и мишева третираних инхибитором галектина-3 детаљније би се испитала улога Gal-3 у развоју и прогресији аутоимунског холангитиса што би указало на нове потенцијалне терапијске стратегије за лечење ове болести.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је да се утврди улога галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом C57BL/6 мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

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

1. Хистолошким скором, биохемијским и серолошким анализама утврдити утицај галектина-3 на развој РВС у експерименталном моделу болести индуковане инфекцијом C57BL/6 мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.
2. Анализом инфилтрата присутним у ткиву јетре инфицираних мишева испитати утицај галектина-3 на: састав инфилтрата, фенотипске карактеристике лимфоцита, фенотипске и функционалне карактеристике НК, НКТ и дендритских ћелија.
3. Испитати утицај галектина-3 на активацију дендритских ћелија бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.
4. Испитати утицај галектина-3 на активацију инфламазома у макрофагима излаганим бактерији *Novosphingobium aromaticivorans*.

5. Испитати да ли примена инхибитора Gal-3 може да ублажи хистолошки скор, биохемијске и серолошке параметре и ублажи фиброзу јетре у моделу РВС изазваним бактеријском инфекцијом.
6. Испитати да ли примена инхибитора Gal-3 смањује активацију инфламазома изазвану бактеријском инфекцијом.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Претходно истраживање улоге Gal-3 у патогенези РВС указује на протективну улогу Gal-3 у примарном билијарном холангитису изазваном имунизацијом C57BL/6 мишева 2-октиноичном киселином. Gal-3 експримиран у холангиоцитима штити ове ћелије од апоптозе, смањује ослобађање аутоантигена, тако смањује стимулацију ћелија које презентују антигене и атенуира РВС. Скорије истраживање указује на проинфламацијску улогу Gal-3 код dnTGF- β RII мишева (енг. *dominant negative form of Transforming Growth Factor Beta Receptor type II*, dnTGF- β RII mice) који спонтано развијају аутоимунски холангитис. Имајући у виду супротне ефекте Gal-3 на ток примарног билијарног холангитиса у два различита модела болести од интереса је да се испита улога овог молекула и у моделу болести који се код мишева изазива инфекцијом убиквитарном, аеробном, G- бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. *Novosphingobium aromaticivorans* је коменсална бактерија слузнице дигестивног тракта људи. Познато је да коменсалне бактерије црева доприносе развоју спонтане инфламације жучних путева па је имунопатогенеза аутоимунског холангитиса који развију мишеви после инфекције овом бактеријом најсличнија патогенетским механизмима РВС код људи. Иако је G- бактерија, *Novosphingobium aromaticivorans* у ћелијском зиду не садржи липополисахариде већ гликофинголипиде који у комплексу са CD1d молекулима дендритских ћелија активирају NKT ћелије. Централну улогу у моделу РВС изазваном имунизацијом ксенобиотиком имају цитокини које продукују активирани мијелоидне ћелије док у моделу изазваном инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* кључну улогу у индукцији аутоимунског процеса играју NKT ћелије.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија на животињама *in vivo* и на материјалу анималног порекла *in vitro*.

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживање ће се обавити на мишицама соја C57BL/6 (енг. *Wild Type*, WT) и Gal-3^{-/-} дефицијентним мишицама на C57BL/6 подлози, старим 8 недеља. Дефицијентни мишеви (енг. *knock-out mice*) потичу са Универзитета Калифорнија Давис и уступљени су љубазношћу D.K. Hsu-а и F.T. Liu-а. Све планиране процедуре у овој студији ће се обављати уз одобрење Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (01-8670, 17.07.2019. године).

2.7.3. Узорковање

Мишице ће бити подељене у следеће групе:

1. C57BL/6 *wild type* мишеви којима се интравенски апликује бактерија
2. C57BL/6 *knock-out* мишеви којима се интравенски апликује бактерија
3. C57BL/6 *wild type* мишеви којима се интравенски апликује бактерија и интраперитонеално инхибитор галектина-3
4. C57BL/6 *wild type* мишеви којима се интравенски апликује физиолошки раствор
5. C57BL/6 *knock-out* мишеви којима се интравенски апликује физиолошки раствор*

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ТЕСТОВИ И АНАЛИЗЕ

Индуковање РВС, дијагноза и праћење тока болести.

Примарна билијарна цироза ће се изазвати интравенском апликацијом 10⁷ бактерија *Novosphingobium aromaticivorans* првог и 15. дана експеримента. Мишеви ће примати инхибитор галектина-3 (DAVANAT) три пута недељно, четири недеље од првог дана експеримента. Узорци серума ће се прикупљати друге, четврте и 8. недеље експеримента. У серумима ће се одређивати концентрација антитела на PDC-E2, коришћењем ELISA технике (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Исечци узорака ткива, добијени након жртвовања животиња, ће се након стандардног третмана бојити хематоксилином и еозином (H&E) и у њима микроскопском анализом регистровати перипортна инфламација, инфилтрација билијарних каналића са и без оштећења као и субкапсуларни инфилтрати. Свака од поментих патолошких промена ће бити оцењиване са: 0= неизмењено; 1= благе; 2= умерене; 3= изражене и 4= врло изражене. Хистолошки индекс I биће израчунаван као средња вредност свих оцењених промена. Поред тога оцењиваће се и присуство гранулома и фиброзе и то: 0= нема; 1= благо; 2= умерено; 3= изражено, а хистолошки индекс II ће бити израчунаван на основу тих вредности.

Исечци ће се бојити још и Сиријус црвеном бојом и то тако што ће се након рехидрације третирати 0.1% раствором боје *Sirius Red F3BA* у засићеној пикринској киселини, у трајању од једног сата. Потом ће се исечци два пута потапати у закишељену воду и три пута у 100% етанол, да би најзад били опрани ксилолом. Процена степена фиброзе у

исечцима мишјих јетри, обојених на овај начин, обавиће се коришћењем програма *ImageJ* (*National Institute of Health, Bethesda, MD*) на 10 видних поља по исечку.

Мерење цитокина. Концентрације цитокина у хомогенатима јетре добијених хомогенизацијом 100mg јетре, ће се мерити ELISA техником употребом мишјег сета за IL-1 β према упутствима произвођача.

Имунохистохемијске анализе. Депарафинисани исечци ће се инкубирати са зечјим моноклонским антителима за мишји IL-1 β и NLRP3 (енг. *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3, NLRP3*) и мишјим моноклонским антителом за Gal-3. Везана антитела ће се визуализовати помоћу конјугата специфичног за зечја и мишја антитела и фотомикрографсањем помоћу дигиталне камере повезане са светлосним микроскопом (Olympus BX51).

Изоловање инфилтришућих мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија. Ћелије ће бити издвојене из ткива јетре као што је то раније описано. Мононуклеарне ћелије ће бити регистроване помоћу моноклонских антитела (обележених флуоресцентним бојама) и то за: CD3, CD4, CD8 α , TCR β , CD49b, NKG2D, perforin, CD1d, I-A/I-E, CD86, T-bet, GATA3, Foxp3, RoRyt, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, CD11c, CD11b, F4/80 и NLRP3. За интрацелуларна бојења цитокина, ћелије ће претходно бити активисане помоћу PMA/јономицина. Обележене ћелије ће бити анализирани помоћу FACSCalibur проточног цитометра (BD Biosciences), а анализа обављена коришћењем програма *FlowJo* (*Tree Star*).

Продукција цитокина и експресија маркера активације након стимулације *in vitro*. Дендритске ћелије изоловане методом магнетне сепарације, из слезине сваког миша појединачно, ресуспендоваће се у комплетном медијуму до густине 10⁶/ml, а NK ћелије изоловане из јетри ће се ресуспендоване до густине 10⁵/ml. По 100 μ l суспензије ће се сипати у микротитар плоче са равним дном (100.000 дендритских, односно 10.000 NK ћелија по бунарчету). Тако припремљене ћелије ће се стимулирати TLR4 агонистом (LPS, *Lipopolysaccharides* из *E. coli* 055:B5) у финалној концентрацији 1 μ g/ml и посебно бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* у односу 1:10 ресуспендованом у комплетном медијуму у трајању од 24 сата. Сваки узорак ће се радити у трипликату. По истеку инкубације плоче ће се центрифугирати 5 минута на 400G и покупити супернатант и издвојене ћелије које ће се анализирати на проточном цитометру. На NK ћелијама ће се анализирати експресија KLRG1, NKG2D, IFN- γ и IL-17, а на дендритским ћелијама експресија CD86, IL-4, IL-12 и NLRP3.

Стимулација перитонеалних макрофага бактеријом *in vitro*. Перитонеални макрофаги ће се издвојити техником перитонелане лаваже комплетним медијумом (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) са додатком FBS (10%), глутамин (2mM), 100U/ml пеницилина и стрептомицина 100mg/ml. Добијене ћелије ће се инкубирати са бактеријом *N. aromaticivorans* 24 сата (однос ћелија/бактерија 1:10) на 37⁰C у инкубатору са 5% CO₂. Неке од ћелија ће се пре излагања бактеријама инкубирати са инхибитором каспазе-1 (Z-YVAD-FMK; 10 μ mol/L). По завршетку инкубације покупиће се супернатант, а ћелије се инкубирати са анти-F4/80, анти-IL-1 β и анти-NLRP3 антителима конјугаованим

флуоресцентним бојама и проточном цитометријом ће се анализирати експресија ових молекула. Концентрације IL-1 β и IL-6 у супернатантима ће се одредити ELISA техником.

Активност каспазе-1. Перитонеални макрофаги (1×10^6 ћелија/отвор) ће се инкубирати 24 сата са *N. aromaticivorans* (1×10^6 бактерија/отвор) у плочама са 6 отвора, а активност каспазе-1 ће се одредити у лизатима ћелија коришћењем *Caspase-1 Colorimetric Kit*-а.

Изолација и *in vitro* стимулација спленоцита. Мононуклеарне ћелије ће се изоловати из слезина како је раније описано (12). Изоловани спленоцити (2.5×10^6 ћелија/отвор) ће се инкубирати са инхибитором галектина-3, DAVANAT-ом (100 μ M), 2 сата, а затим ће се стимулирати LPS-ом 1 μ g/ml 24 сата. Концентрација Gal-3 у супернатантима ће се одредити коришћењем *Duoset* ELISA сета.

Имунофлуоресценца. Изоловани перитонеални макрофаги (10^6 ћелија/отвору) ће се инкубирати 7 дана у плочама са 6 отвора у које су стављене округле покровне љуспице и то у присуству *N. aromaticivorans* (10^7 бактерија/отвору). Ћелије ће се затим обележити анти-F4/80, анти-IL-1 β и анти-NLRP3 антителима, затим ће се инкубирати са секундарним антителима конјугованим PE или FITC бојом. Љуспице ће се залепити за предметна стакла коришћењем *ProLong Gold antifade reagent with DAPI* и фотографисаће се коришћењем Olympus BX51 флуоресцентног микроскопа.

Анализа експресије гена реакцијом ланчаног умножавања (енг. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Из ткива јетре ће се издвојити РНК коришћењем тризола. Потом ће се из РНК методом реверзне транскрипције добити једноланчана комплементарна ДНК и анализирати релативна експресија гена за NLRP3, проколаген $\alpha 1$, α -SMA у односу на експресију *housekeeping* гена за β -*actin*.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независна варијабла: присуство/одсуство галектина-3.

Зависне варијабле: хистолошки скор, количина антитела специфичних за PDC-E2 у серуму, проценат фиброзе у ткиву јетре, концентрације трансминаза у серуму, концентрације цитокина, проценти активираних и инфламацијских лимфоцита NK, NKT и дендритских ћелија и ниво експресије NLRP3, проколагена $\alpha 1$, α -SMA у ткиву јетре.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student*-ов *t* тест (два независна узорка), упоређујући 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 (процент CD4+ Т лимфоцита у јетри) између експерименталних и контролних група (10), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 20 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's t*

тестом за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе животиња, са снагом студије $\geq 80\%$.

2.7.6. Статистичка обрада података

Подаци ће се анализирати коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, испитаће се правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ће се тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користиће се 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) или стандардна девијација (SD). 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 мишеви са делецијом гена за Gal-3 као и мишеви третирани инхибитором галектина-3 имају знатно блажу форму примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* са значајно мањом инфилтрацијом ткива јетре моноклеарним ћелијама. Ово очекивање засновано је претпоставци да Gal-3 игра значајну улогу у индукцији имунског одговора на *Novosphingobium aromaticivorans*, тј. да у одсуству овог молекула нема адекватног развоја имунског одговора на бактерију, а како бактерија садржи конзервирани епитоп PDC-E2 сличан хуманом антигену, поремећена је и активација аутореактивних лимфоцита.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Примарни билијарни холангитис је хронична болест у чијој су патогенези имунски механизми одговорни за деструкцију малих интрахепатичних жучних путева. За разлику од већине аутоимунских болести у PBC је познат имунодоминантни аутоантиген- PDC-E2 исказан у холангиоцитима интрахепатичних жучних каналића.

Галектин-3 је гликопротеин присутан како у ћелији тако и на ћелијској мембрани и у екстраћелијским течностима. Овај мултифункционални молекул игра различите и често бидирекционе улоге у различитим физиолошким и патолошким процесима јер на различите начине учествује у регулацији круцијалних механизмима модулације инфламацијских и имунских реакција као што су: стабилизација органела; трансдукција

сигнала; контрола ћелијске смрти; адхеренција; препознавање микроорганизама; активација, диференцијација и миграција лимфоцита и многе друге. Раније је показано да Gal-3, експримиран у холангиоцитима, штити ове ћелије од апоптозе смањујући тако ослобађање аутоантигена што спутава активацију APC и ублажава PBC. Супротно, показано је да Gal-3 може деловати и проинфламацијски код dnTGF- β RII мишева који спонтано развијају аутоимунски холангитис. Имајући у виду показане супротне учинке Gal-3 на ток PBC-а у различитим моделима планирано је испитивање улоге Gal-3 у PBC-у изазваном инфекцијом *Novosphynobium aromaticivorans*- моделу болести патогенетски најсличнијем PBC код људи.

Циљ студије је да се испита улога галектина-3 у патогенези мишјег PBC-а, изазваног бактеријом *Novosphynobium aromaticivorans*. Као експерименталне животиње користиће се Gal-3 дефицијентне и Gal-3 позитивне мишице соја C57BL/6 (WT), старости до 8 недеља. Животиње ће бити инфициране бактеријом *Novosphynobium aromaticivorans*, а одређен број WT мишева примаће и инхибитор галектина-3 (DAVANAT). Дијагноза болести и евалуација оштећења ће се обављати хистолошким анализама ткива јетре, детекцијом фиброзе и мерењем концентрација антитела на кључни антиген PDC-E2 (E2 компонента пируват дехидрогеназе). Да би се детаљније расветлила улога Gal-3 у настанку и развоју болести испитаће се и фенотипске карактеристике мононуклеарних ћелија које инфилтришу јетру као и улога овог молекула у активација инфламатома.

Очекује се да мишеви са делецијом гена за Gal-3 као и WT мишеви третирани инхибитором галектина-3 имају знатно блажу форму аутоимунског холангитиса. Одсуство или инхибиција галектина-3 инхибира активацију инфламатома изазвану бактеријом *Novosphynobium aromaticivorans* и ублажава аутоимунски холангитис.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор 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. 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.
3. 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. doi: 10.3389/fimmu.2017.00192
4. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol* 2015; 89(3):437-50
5. Pejnovic N, Pantic J, Jovanovic I, Radosavljevic G, Milovanovic M, Nikolic I, Zdravkovic N, Djukic A, Arsenijevic N, Lukic M. Galectin-3 Deficiency Accelerates High-Fat Diet Induced Obesity and Amplifies Inflammation in Adipose Tissue and Pancreatic Islets. *Diabetes* 2013;62(6):1932-1944.
6. 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.
7. 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.
8. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res* 2012; 52(1-2):89-99.
9. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu D.K, Lukic M.L. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res* 2012; 52(1-2):100-110
10. 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. 25.
11. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic M. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A induced hepatitis. *Journal of Hepatology* 2012; 56(1):26-33.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Имунологија, инфекција и инфламација.

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија
3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Александра Арсенијевића, 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. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да утврди улогу галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом C57BL/6 мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

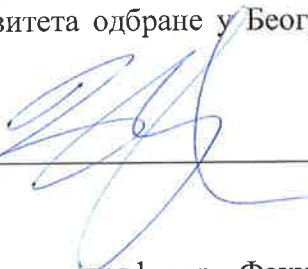
Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Александра Арсенијевића под називом **"Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома"** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

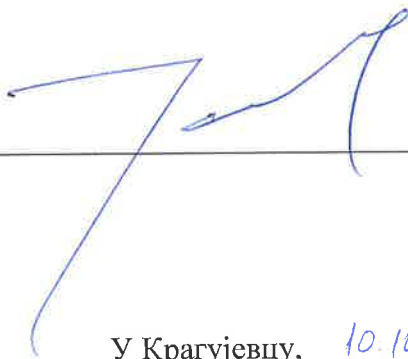
1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник



2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан



3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан



У Крагујевцу, 10.10.2019.