

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-6852/3-2 од 06.10.2010 год, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Гордане Радосављевић** под називом:

"Значај експресије галектина-3 за метастазирање малигног меланома миша: модулација адхезије и ћелијске цитотоксичности"

На основу одлуке Изборног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Гордана Коњевић, ванредовни професор за ужу научну област Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Гордана Радосављевић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

Гордана Радосављевић рођена је 13. 07. 1976. године у Крагујевцу. Основну школу и средњу медицинску школу завршила је у Крагујевцу. Медицински факултет у Крагујевцу, уписала је школске 1995/96. године, а дипломирала 03. јуна 2003. године са просечном оценом 8,23 и тиме стекла звање доктора медицине. Обавила је општи

лекарски стаж и положила стручни испит. Магистарске студије—смер Имунологија уписала је школске 2003/2004. године на Медицинском факултету у Крагујевцу. У октобру 2005. године положила је усмени магистарски испит са оценом 10 (десет). У школској 2005/2006. години уписала је трећу годину Академских докторских студија на Медицинском факултету у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Усмени докторски испит положила је 26.06.2007. године са оценом 9 (девет). 2006. и 2009. године бирана је у звање асистента у настави за ужу научну област Микробиологија и имунологија. У школској 2008/2009. години уписала специјалистичке студије из Имунологије. Члан је Друштва имунолога Србије.

Б. Научно истраживачки рад

Кандидат Гордана Радосављевић се кроз разне видове укључивала у наставни и научно-истраживачки рад. Активно се бави научно истраживачким радом у лабораторији за Клиничку и експерименталну имунологију и онкологију, Медицинског факултета у Крагујевцу. Континуирани научно истраживачки огледа се у учешћу на Јуниор пројектима Медицинског факултета у Крагујевцу:

- "Улога Галектина-3 и ST2 у активацији и функцији НК ћелија у туморским моделима" (бр. 01-9462)
- "Имунски феномени код малигнух обољења" (бр.01-2106)
- "Експресија p16, p53 и VEGF, и цитокински профил у малигномима колоректалне регије" (бр. 01-453)
- "Значај цитокинског профила пацијената у етиопатогенези психотичних поремећаја" (бр.1-9336)

В. Подаци о објављеним радовима

Кандидат Гордана Радосављевић остварила је 24,3 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- четири рада у целини публикована у научним часописима међународног значаја;
- шест радова у целини публикована у националним часописима;
- већи број сажетака на међународним и домаћим научним скуповима

Од поменутих радова за извештај су релевантни:

1. **Radosavljevic G.** Ljubic B, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumour marker in patients with colorectal carcinoma. Neoplasma 2010; 57(2):135-144. **M23 – 3 бода**
2. B. Ljubic, **G. Radosavljevic.** I. Jovanovic, S. Pavlovic, N. Zdravkovic, M. Milovanovic, Lj. Acimovic, M. Knezevic, D. Bankovic, D Zdravkovic and N. Arsenijevic. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. Archives of Medical Research 2010; 41:182-189. **M23 – 3 бода**
3. Protrka Z, Mitrović S, Arsenijević N, Baskić D, **Radosavljević G.** Stanković M. and Arsenijević S. HER-2 expression in uterine cervix carcinogenesis. J BUON 2007; 12:91-97. **M23 - 3 бода**

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

"Значај експресије галектина-3 за метастазирање малигног меланома миша: модулација адхезије и ћелијске цитотоксичности"

Предмет:

Галектин-3, лектин са високим афинитетом за β -галактозиде је експримиран на бројним ћелијама, а нарочито на малигним и ћелијама имунског система. Сматра се да овај молекул има значајну улогу у прогресији тумора тако што стимулише инвазију, миграцију и адхезију малигнућ ћелија, и омогућава малигним ћелијама да избегну анти-туморски имунски одговор. Циљ ове студије је да се утврди улога галектина-3 у метастазирању мишијег малигног меланома (B16F1). Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја C57BL/6 (wild type) и нокаут мишеве (Gal-3^{-/-}) на C57BL/6 подлози, старости до 12 недеља. Експериментане метастазе ћемо индуковати интравенском апликацијом ћелија мишијег малигног меланома (B16F1). Проточном цитометријом, уз комбинацију одговарајућих моноклонских анти-мишијих антитела испитаћемо фенотипске карактеристике спленоцита и NK ћелија пре и после апликације малигнућ ћелија. Цитотоксичност укупних и адхерентних спленоцита, као и NK ћелија слезине мерићемо МТТ-тестом. У серуму ћемо одређивати цитокински профил током анти-туморског имунског одговора. У овој студији очекујемо да одсуство галектин-3 сигналног пута чини C57BL/6 мишеве резистентним на метастазе. Могући механизми одговорни за њихову резистенцију су смањена адхезивност малигнућ ћелија за ендотел, и/или повећана цитотоксичност спленоцита и NK ћелија. Добијени резултати могли би да укажу на могућност коришћења високо специфичних инхибитора галектина-3 у експерименталној терапији тумора.

Хипотезе:

1. Одсуство гена за галектин-3 чини C57BL/6 мишеве релативно резистентним на метастазе, смањујући адхезивност малигнућ ћелија за ендотел а повећавајући цитотоксичност ћелија слезине.
2. Појачан цитотоксични потенцијал укупних спленоцита мишева генетски дефицијентних у експресији галектина-3 је последица промењене активности NK ћелија.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат, Гордана Радосављевић положила је усмени докторски испит 26.06.2007. године са оценом 9 (девет). У току студија објавила је четири рада у научним часописима међународног значаја и шест радова у националним часописима, од чега три рада у којима је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Галектин-3 је лектин са високим афинитетом за β -галактозиде. Овај гликопротеин има различиту дистрибуцију у ћелији и на њу утичу бројни фактори као што су тип ћелије, њен пролиферативни статус и малигна трансформација ћелије. Присутан је у једру, цитоплазми, митохондријама, на површини ћелија, а у секретованом облику налази се и у ткивним течностима. У зависности од локализације и везивањем за различите лиганде регулише ћелијску пролиферацију, диференцијацију и апоптозу.

Екстраћелијски, учествује и у адхезивним процесима функционишући као мост између ћелија, као и ћелија и екстрацелуларног матрикса. Сматра се да галектин-3 има значајну улогу и у процесима важним за настанак и развој тумора: малигну трансформацију, инвазију и метастазирање.

Метастазирање тумора представља сложен процес који се дешава каскадно. Мада развој метастаза има насумичан изглед, у основи то је регулисан процес и заснива се на адхезији малигнућ ћелија за васкуларни ендотел. Сматра се да за успешно формирање метастатских колонија важну улогу има везивање циркулишућих малигнућ ћелија за васкуларни ендотел који исказује специфичан сет површинских молекула у различитим органима. Описани су бројни адхезивни молекули који везујући одговарајуће лиганде на циркулишућим малигнућ ћелијама омогућују њихово селективно преживљавање. Тиме се објашњава да, иако током дисеминације у циркулацији доспева велики број малигнућ ћелија, ипак само мали проценат ћелија успева да преживи и формира метастазе. Новија истраживања указују да галектин-3 који је конститутивно експримиран на васкуларном ендотелу плућа, игра кључну улогу у почетној адхезији циркулишућих малигнућ ћелија мишићег меланома В16F10 за ендотел плућа. Могућ механизам којим ендотелни галектин-3 доприноси процесима метастазирања подразумева његово везивање за угљенохидратне лиганде на малигнућ ћелијама. Осим у адхезији, сматра се да галектин-3 има удео и у другим процесима важним за успешно формирање метастаза. Наиме, показано је да он инхибира апоптозу туморских ћелија чиме се објашњава њихова резистенција на хемо- и радиотерапију. Такође, бројне студије указују на значајну улогу галектина-3 и у неоангиогенези јер подстиче пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија. Међутим, улога галектина-3 у регулацији метастаза *in vivo* није испитивана.

Основни механизам имунског одговора против тумора је убијање туморских ћелија механизмима ћелијског стеченог имунитета, као и механизмима урођеног имунитета. Иако је галектин-3 експримиран на различитим ћелијама имунског система: на макрофагама, дендритским ћелијама, еозинофилима, мастоцитима, активираним Т и В лимфоцитима, мало се зна о његовој улози у анти-туморском одговору. Новије студије указују да овај молекул утиче на преживљавање и функционисање ефекторских Т лимфоцита у околини тумора. Показано је да индукује апоптозу тумор-инфилтришућих лимфоцита у хуманом малигнућ меланому, као и тумор-специфичних CD8⁺Т лимфоцита у мишићем моделу колоректалног карцинома. Поред апоптозе, Demotte N. и сарадници указују да галектин-3 повећавањем растојања између Т-ћелијског рецептора и корецептора CD8 индукује анергију тумор-специфичних цитотоксичких Т лимфоцита. Претпоставља се да овај молекул испољава имуномодулаторни ефекат и у урођеном имунском одговору. Резултати истраживања MacKinnon AC. и сарадника указују да галектин-3 везујући CD98 молекул стимулише продукцију IL-4 и IL-13 и тиме индукује алтернативну активацију макрофага. Бројне студије су показале да алтернативно активирани макрофаги у туморском ткиву (познати и као TAM2 макрофаги; од енгл. Tumor-associated macrophages 2) продукцијом различитих солубилних фактора супримирају анти-туморски имунски одговор и тиме доприносе бржем расту и метастазирању тумора. NK ћелије као ефекторске ћелије урођеног имунског одговора, такође играју важну улогу у одбрани од слабо имуногених тумора као што је малигни меланом. Бројне студије засноване на амплификацији, деплецији или инхибицији NK ћелија, показале су да ове ћелије имају значајан удео у анти-туморској имуности у мишићем моделу малигнућ меланома. Међутим, улога галектина-3 на туморицидну активност NK ћелија није испитивана. Због свега наведеног, било би од интереса видети какав је број и функција NK ћелија код мишева дефицијентних у

експресији галектина-3 пре и током имунског одговора на туморске ћелије и у којој мери контрибуирају у цитотоксичној активности спленоцита.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Основни циљ овог истраживања је да се утврди улога галектина-3 у метастазирању малигног меланома користећи комплементарне експерименталне приступе *in vivo* и *in vitro*, мишеве генетски дефицијентне у експресији галектина-3.

У складу са основним циљем поставили смо и следеће циљеве:

Ad1. Утврдити везу између одсуства гена за галектин-3 и броја и волумена метастатских колонија малигног меланома.

Ad2. Пре и током имунског одговора на ћелије малигног меланома испитати утицај експресије галектина-3 на:

-цитотоксични потенцијал укупних и адхерентних спленоцита, као и NK ћелија слезине.

-фенотипске карактеристике спленоцита и NK ћелија.

Ad3. Испитати утицај експресије галектина-3 на цитокински профил у моделу малигног меланома.

На основу добијених резултата истраживања моћи ћемо боље да сагледамо утицај галектина-3 у метастазирању, као и његов учинак у специфичној и неспецифичној анти-туморској активности у мишјем моделу малигног меланома. Добијени резултати могли би да укажу на могућност коришћења високо специфичних инхибитора галектина-3 у експерименталној терапији тумора.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У досада објављеној и нама доступној литератури сматра се да галектин-3 има значајну улогу у процесима важним за настанак и развој тумора: малигну трансформацију, инвазију и метастазирање. Међутим, улога галектина-3 у регулацији метастаза *in vivo* није испитивана. Наша студија би требало да по први пут испита да ли су мишеви генетски дефицијентни у експресији галектина-3 резистентнији на успостављање метастаза. Значај студије је и ближе и детаљније упознавање механизма одговорних за њихову потенцијалну резистенцију.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње: Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја C57BL/6 (wild type) и нокаут мишеви (Gal-3^{-/-}) на C57BL/6 подлози, мушког и женског пола, старости од 8 до 12 недеља. Све експерименталне и контролне групе у истраживању обухватиће по 50 мишева.

Модел експерименталних метастаза: Експерименталне метастазе индуковаћемо апликацијом ћелија мишјег малигног меланома (malignant melanoma cell line B16F1), сингене за C57BL/6 мишеве. Туморске ћелије убризгаћемо интравенски у латералну репну вену у дози од 5×10^4 ћелија у 200 μ l DMEM-а.

Верификација броја и величине метастаских колонија: 21-ог дана од убризгавања малигнућ ћелија жртвоваћемо мишеве и узићемо крв из абдоминалне аорте. Изоловаћемо плућа, слезину, јетру и мозак и од њих ћемо направити парафинске препарате које ћемо обојити стандардним патохистолошким бојењем (еозин-

хематоксилин). Микроскопирањем под светлосним микроскопом, одредићемо број и величину метастатских колонија.

Адхезивни тест: Криостатске исечке ткива плућа инкубраћемо са суспензијом малигнух ћелија B16F1 (5×10^3 ћелија у $100 \mu\text{l}$ PBS-a), 1 сат у инкубатору (37°C , 5% CO_2). Одлићемо оне ћелије које се нису везале, а затим ћемо исечке пажљиво испрати у PBS-у. Везане ћелије фиксираћемо у метанолу, а затим ћемо исечке обојити еозин-хематоксилином. Везане малигне ћелије бројаћемо у 100 видних поља, у трипликату.

Изолација ћелија: Након жртвовања мишева изоловаћемо слезину. Пропуштањем кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) добићемо једноћелијску суспензију (спленоцити). За изолацију NK ћелија, предходно изоловане спленоците инкубираћемо са магнетима-коњугованим анти-CD49b антителом (DX5, Miltenyi Biotec), а затим ћемо их пропустити кроз LS колоне магнетног MACS сепаратора.

Цитотоксичност ћелија: Цитотоксични потенцијал мерићемо 4h MTT- тестом, након 24-часовне кокултивације туморских ћелија (таргет) са спленоцитима, адхерентним ћелијама и NK ћелијама (ефекторске ћелије) у различитим односима. Процент цитотоксичности одредићемо према формули: цитотоксичност (%) = $[1 - (\text{ефекторске и туморске ћелије (абсорбанца)} / \text{ефекторске ћелије (абсорбанца)})] \times 100$.

Ћелијски састав слезине: Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских анти-мишјих антитела (CD3, CD4, CD8 и CD19) одредићемо процентуални удео и укупан број различитих популација Т и В лимфоцита у слезини.

Квантификација и фенотипизација NK ћелија: Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских анти-мишјих антитела (CD3, CD19 и NK1.1) одредићемо процентуални удео и укупан број NK ћелија у слезини. Комбинацијом поменутих антитела са анти: KLRG, CD69, NKG2D, CD27 и CD11b одредићемо активациони статус NK ћелија пре и после апликације тумора.

Одређивање серумског нивоа цитокина у серуму: Одређиваћемо серумске нивое цитокина IL-17, IL-4, IFN-gama и TNF- α стандардном ELISA техником, коришћењем ELISA сетова специфичних за мишје цитокине (R&D Systems Minneapolis, MN), према упутствима произвођача.

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Предвиђени број животиња, по 50 у свакој групи, израчунат је према претпостављеној величини ефеката, задатој вредности коефицијента $\alpha=0.05$ и вредности снаге студије од 80%.

Врста студије

Експериментална студија

Статистичка обрада

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користићемо параметарски Student's 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

У овој студији очекујемо да одсуство гена за галектин-3 чини мишеве резистентним на метастазе, смањујући адхезивност малигнућ ћелија за ендотел, а повећавајући цитотоксичност ћелија слезине. Појачан цитотоксични потенцијал укупних спленоцита на слабо имуногени малигни меланом у мишева генетски дефицијентних у експресији галектина-3 је последица промењене активности НК ћелија. Добијени резултати могли би да укажу на могућност коришћења високо специфичних инхибитора галектина-3 у експерименталној терапији тумора.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи комплементарне експерименталне приступе *in vivo* и *in vitro* мишеве генетски дефицијентне у експресији галектина-3, биће испитана улога галектина-3 у метастазирању малигног меланома. Пре и током имуноског одговора на ћелије малигног меланома испитаћемо утицај експресије галектина-3 на цитокински профил, као и цитотоксични потенцијал и фенотипске карактеристике спленоцита и НК ћелија слезине.

2.10. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

2.11. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Гордана Коњевић, ванредовни професор за ужу научну област Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Београду, члан

Закључак и предлог Комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Гордана Радосављевић, испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације;
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна;
3. Комисија сматра да ће докторска дисертација кандидата др мед. Гордане Радосављевић указати да постоје статистички значајни резултати и показатељи да галектин-3 игра важну улогу у развоју метастаза у мишићем моделу малигног меланома, чинећи га потенцијалном метом у експерименталној терапији тумора;

4. Комисија предлаже Већу ментора Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Гордане Радосављевић, под називом "**Значај експресије галектина-3 за метастазирање малигног меланома миша: модулација адхезије и ћелијске цитотоксичности**" и одобри њену изравду.

Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Небојшу Арсенијевића, редовног професора за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу. Проф. др Небојша Арсенијевић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом, као и искуство и остварене резултате у развоју научно-наставног подмлатка.

У Крагујевцу
14.10.2010.г.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, председник редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија
-

2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, члан редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије
-

3. **Проф. др Гордана Коњевић**, члан ванредовни професор Медицинског факултета у Београду, за ужу научну област Основи онкологије
-