

1. Одлука Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-12526/3-4 од 27.11.2013. год, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Илије Јефтића** под називом:

" УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ"

На основу одлуке Научно-наставног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан
3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
4. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. Др Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник за ужу научну област Биологија – Имунологија, Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Илија Јефтић**, 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

Илија (Драган) Јефтић рођен је 26.09.1982. године у Краљеву. Медицински факултет у Крагујевцу уписао је 2001. године, а дипломирао октобра 2007. године са просечном оценом 9,14. Обавио је општи лекарски стаж и положио стручни испит. Докторске академске студије, смер Клиничка и експериментална интерна медицина уписао је школске 2007/08, а усмени докторски

испит положио је 02.03.2011.године са оценом 10 (десет). Од 19.12.2008. запослен на Медицинском факултету као сарадник у настави за ужу научну област Патолошка физиологија, а децембра 2010.године биран је у звање асистента у настави за исту ужу научну област.

Б. Научно истраживачки рад

Кандидат, др мед. Илија Јефтић се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. Учесник је Макро пројекта, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

1. МП 01-12 „Имунопатологија инфламаторних, аутоимунских и малигнух обољења“

Као и Јуниор пројекта, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

1. ЈП 06-12 „Апоптоза лимфоцита периферне крви и фреквенција микронуклеуса код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде који су лечени радиоактивним јодом 131“

В. Подаци о објављеним радовима

В1. Радови објављени у часописима међународног значаја (Категорија М20)

1.1. Olgica Vrndic, Svetlana Savin, Ljiljana Mijatovic, Aleksandar Djukić, **Ilija Jeftic** and Snezana Zivancevic-Simonovic. Concentration of thyroglobulin and thyroglobulin-specific autoantibodies in patients with differentiated thyroid cancer after treatment with radioactive Iodine 131. Labmedicine (2011), 42 (1) 27-31. **M23=3 бода**

1.2. Vrndic O, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, Mijatovic L, **Jeftic I** and Zivancevic Simonovic S. Radioiodine therapy accelerates apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with differentiated thyroid cancer. Neoplasma, doi: 10.4149/neo_2013_074, 2013;60(5):568-75. *in press* **M23=3 бода**

В2. Зборници међународних скупова (Категорија М30)

2.1. Snezana Zivancevic-Simonovic, Olgica Vrndic, **Ilija Jeftic**, Svetlana Savin, Ljiljana Mijatovic. Concentrations of thyroglobuline and antithyroglobuline autoantibodies in patients with differentiated thyroid cancer after therapy by radioiodine 131. Cape Town, 2010; Abstract book: pp. S188-S189. **M34=0.5 бодова**

2.2. Snezana Zivancevic-Simonovic, Olgica Vrndic, **Ilija Jeftic**, Marijana Stanojevic, Aleksandar Djukic, Ljiljana Mijatovic. Thyroglobulin concentrations measured in the presence of antithyroglobulin antibodies. Cape Town, 2010; Abstract book: pp. S111. **M34=0.5 бодова**

2.3. Snezana Zivancevic-Simonovic, Olgica Vrndic, **Ilija Jeftic**, Marijana Stanojevic, Aleksandar Djukic, Ljiljana Mijatovic. Thyroglobulin concentrations measured by immunoradiometric assay and the influence of thyroglobulin antibodies. Montreal, 2010. Abstract book: pp. S133. **M34=0.5 бодова**

В3. Часописи националног значаја (Категорија М50)

3.1. Baskic D, Radosavljevic G, Cokanovic V, **Jeftic I**, Zelen I, Popovic S, Pavlovic S, Arsenijevic H. Serumski nivo NO, IL-12, MDA kod pacijenata sa karcinomom dojke. Medicus 2005 6(2), 62-65 **M52=1.5 бодова**

3.2. **Ilija Jeftić**, Irena Kostić, Olgica Vrndić, Vojin Kovačević. Feohromocitom: genska osnova, klinička slika i savremene mogućnosti dijagnostike. Medicinski časopis 2010, vol 44 (1):45-50; **M53=1 бод**

3.3. Olgica Vrndić, Ilija Jeftić, Irena Kostić, Marijana Stanojević, Snežana Živančević-Simonović. Hashimoto encefalopatija, Medicinski časopis 2010, 44 (1): 41-44; **M53=1 бод**

3.4. Olgica Vrndić, Irena Kostić, Ilija Jeftić, Marijana Stanojević, Snežana Živančević-Simonović. Patofiziološki mehanizmi procesa starenja, Medicinski časopis 2010, 3: 30-36; **M53=1 бод**

3.5. Vojin Kovačević, Miodrag Peulić, Radivoje Nikolić, Milan Mijailović, Snežana Lukić, Marina Miletić – Kovačević, Ilija Jeftić. Cerebralni vazospasam nakon nakon aneurizmalne subarahnoidalne hemoragije, mogućnosti i ishod lečenja. PONS Med J 2013, 10 (1): 17-23 **M53=1 бод**

3.6. Nemanja Jovičić, Ilija Jeftić, Uglješa Jovičić. Uloga B limfocita u razvoju multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa. PONS Med J 2013, 10 (3) in press; **M53=1 бод**

B4. Зборници скупова националног значаја (Категорија M60)

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

" Улога галектина-3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности"

Предмет:

Неалкохолна масна болест јетре (енгл. NAFLD - Nonalcoholic fatty liver disease) обухвата различит спектар болести, од једноставне стеатозе која представља акумулацију масти у јетри па до неалкохолног стеатохепатитиса (енгл. NASH - Nonalcoholic steatohepatitis), цирозе и могућег настанка хепатоцелуларног карцинома. Тачан узрок NASH -а није познат, ипак зна се да се често јавља код особа са одређеним медицинским стањима као што су гојазност, дијабетес и инсулинска резистенција. Патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена.

Као експерименталне животиње биће коришћени галектин-3 (Gal-3) дефицијентни (енгл. knockout, LGALS3^{-/-}) и Gal-3 позитивни мишеви соја C57BL/6 (енгл. wild-type, WT), мушког пола, старости од 6 до 8 недеља. Гојазност ће бити индуковани применом дијете са високим садржајем масти (60%) у трајању 24 недеље. Део експерименталних животиња ће у 19. недељи примити две дозе стрептозотоцина са циљем индукције тип 2 Diabetes mellitus-а. Метаболички параметри развоја болести биће праћени периодично. Параметри инфламације (степен и фенотип инфилтрованих инфламаторних ћелија и експресија интраћелијских цитокина) биће одређивани у циљним ткивима након жртвовања методом проточне цитометрије и имунохистохемије /имунофлуоресценце. Степен масне инфилтрације и фиброзе јетре биће одређивани специјалним хистолошким бојењима, а квантификовани корићењем скорa и програма *ImageJ*. Нивои цитокина, инсулина и трансaminaза у серуму биће одређивани ELISA тестом.

Аблација гена за Gal-3 индукује убрзан развој гојазности у условима повећаног енергетског уноса. Gal-3 дефицијентни мишеви имају увећану телесну масу, количину висцералног адипозног ткива, гликемију наше и инсулинемију, као и присутне параметре инфламације у висцералном масним ткиву, панкреасу и системској циркулацији. У условима дијете са високим садржајем масти долази до повећања крајњих продуката метаболизма липида и глукозе, који покрећу инфламацију у различитим метаболичким ткивима. Могућа протективна улога Gal-3 у развоју стеатозе и следствене инфламације у јетри (стеатохепатитиса) огледа се у томе што овај молекул има улогу у везивању и одстрањивању крајњих продуката метаболизма глукозе (енгл. advanced glycation end-products, AGE) и липида (енгл. advanced lipoxidation endproducts, ALE), као и ендотоксина који су окидачи хроничне инфламације у метаболичким ткивима. Са друге стране када је процес фиброгенезе у јетри у питању, показано је да делеција гена за Gal-3 блокира

активацију миофибробласта и значајно редукује фиброзу у јетри.

Хипотезе:

Gal-3 има протективну улогу у развоју стеатозе и стеатохепатитиса, а профиброгену улогу у развоју фиброзе јетре у условима повећаног енергетског уноса исхраном богатом мастима.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат, др мед. Илија Јефтић положио је усмени докторски испит 02.03.2011.године са оценом 10 (десет). У току студија објавио је више радова у часописима међународног и националног значаја, од чега једна као први аутор чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Неалкохолна масна болест јетре је најчешћа болест јетре у развијеним земљама света и обухвата спектар болести: једноставну стеатозу која представља акумулацију масти у јетри, неалкохолни стеатохепатитис са присутном инфламацијом, цирозу и могући настанак хепатоцелуларног карцинома. Термин неалкохолни стеатохепатитис је први пут употребљен са циљем да се опише стање узроковано акумулацијом масног ткива у јетри, дегенерацијом хепатоцита, инфилтрацијом и фибризом. Иако слично стање може да се јави код особа које злоупотребљавају алкохол, NASH настаје код особа које пију мало или нимало алкохола. Тачан узрок NASH -а није познат, ипак зна се да се често јавља код особа са одређеним медицинским стањима као што су гојазност, дијабетес и инсулинска резистенција. Патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена, најшире је прихваћена теорија „два удараца“. „Први ударац“ представља екцесивну акумулацију липида која је последица инсулинске резистенције док се оксидативни стрес, активација проинфламаторних сигналних путева, продукција проинфламаторних цитокина и адипокина од стране висцералног адипозног ткива (ВАТ), продукција ендотоксина од стране бактерија пореклом из гастроинтестиналног тракта (ГИТ), активација инфлазама, сматрају потенцијалним факторима који су одговорни за „други ударац“ односно оштећење хепатоцита, инфламацију и последичну фиброзу. Један од претпостављених механизма је да поремећен метаболизам масних киселина сам по себи може да доведе до настанка NASH-а. Слободне масне киселине индукцијом стреса ендоплазматског ретикулума, активацијом JNK (енгл.с-Jun N-terminal kinase) транскрипционих фактора и повећаном продукцијом реактивних форми кисеоника, могу бити одговорне за прогресију стеатозе у NASH. Најновија истраживања су показала да се у мишијем моделу индуковане гојазности, хронична инфламација ниског степена (енгл. low-grade inflammation) у ВАТ-у дешава од 6-16. недеље, док се сличан процес у јетри дешава у периоду између 16. и 26. недеље. Кључни показатељи инфламације у јетри укључују CD11c и CD11b позитивне макрофаге, интерлеукин (IL)-1 β и фактор некрозе тумора (енгл. tumor necrosis factor, TNF) – α . Показано је да је инфилтрација масног ткива макрофагима одговорна за рану фазу инсулинске резистенције, како у јетри тако и у периферним ткивима, као и да уклањање макрофага пореклом из масног ткива не спречава настанак инфламације у јетри. Са друге стране активација Toll-like рецептора 4 (TLR - engl. Toll-like receptors) слободним масним киселинама или ендотоксином пореклом из ГИТ-а, доводи до активације NF κ B (енгл. Nuclear factor- κ B) укљученог у регулацију експресије проинфламаторних гена, што за последицу има продукцију проинфламаторних хемокина и цитокина који имају снажан ефекат на регрутовање циркулаторних макрофага у јетру и активацију Купферових и стелатних ћелија, кључних ћелија у процесу фиброгенезе. Најновија истраживања су показала да засићене масне киселине, као један од метаболичких продуката, путем активације NLRP3 (енгл. NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3) инфлазама и последичног ослобађања активне каспазе-1, индукују продукцију активног IL-1 β . Такође је показано да хепатоцити изложени дејству палмитинске киселине у садејству липополисахарида продукују IL-1 β . Даља прогресија у правцу цирозе може захтевати и „трећи ударац“ који посебно промовише фиброзу, индукцијом диференцијације стелатних ћелија у правцу настанка миофибробласта, процеса који обухвата померање имунског одговора у правцу Th2 и поларизацију макрофага у правцу M2 фенотипа. Многе студије су показале да је активација Th2

имунског одговора кључни фактор у прогресији фиброзе. Продукција IL-13 је веома битна у развоју фиброзе јетре када је у питању NASH. Механизам којим IL-13 фаворизује процес фиброзе подразумева стимулацију продукције TGF- β 1. Друге студије пак објашњавају да IL-13 индукује фиброзу механизмима независним од продукције TGF- β 1, директном активацијом синтетских и пролиферативних карактеристика фибробласта.

Галектин-3 је члан фамилије β -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У јетри Gal-3 је нормално експримиран у Купферовим ћелијама и епителним ћелијама билијарног канала, док га здрави хепатоцити не експримирају. Досадашњим истраживањима делеција гена за Gal-3 доведена је у везу са неалкохолном масном јетром, тачније показано је да Gal-3 дефицијентни мишеви у узрасту од 6 месеци развијају NAFLD. Такође је показано да је делеција Gal-3 повезана са дисрегулацијом у метаболизму глукозе, повећаном количином висцералног адипозног ткива као и системском инфламацијом. Један од могућих механизма протективног ефекта Gal-3 везан је за његову функцију рецептора за крајње продукте метаболизма глукозе и липида, њиховој деградацији и уклањању из циркулације у условима повећаног флукса ових метаболита, који настају као последица енергетског дисбаланса организма. Најновија истраживања су такође показала да у мишијем моделу индуковане гојазности, делеција Gal-3 погоршава инфламацију у панкреасу и висцералном адипозном ткиву. Са друге стране када је процес фиброгенезе у јетри у питању, показано је да делеција гена за Gal-3 блокира активацију миофибробласта и експресију проколагена I *in vitro* и *in vivo* и значајно редукује фиброзу у јетри. Активирани стелатне ћелије, тј. миофибробласти, експримирају Gal-3, а такође је показано да је Gal-3 неопходан за активацију ових ћелија од стране Купферових ћелија.

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

Главни циљ истраживања

Испитати улогу Gal-3 у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

- Дефинисати и квантификовати масну инфилтрацију јетре (стеатозу јетре) коришћењем циљаних хистолошких бојења;
- Дефинисати и квантификовати фиброзу јетре коришћењем циљаних хистолошких бојења;
- Дефинисати и квантификовати стеатохепатитис применом скор система (инфилтрација 0-3, стеатоза 0-4, фиброза 0-4, дегенерација хепатоцита 0-1);
- Испитати биохемијске параметре оштећења јетре одређивањем концентрације АЛТ и АСТ у серуму;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и процесу фиброзе у јетри;
- Пратити развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести; утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у панкреасу;

- Пратити развој инсулинске резистенције одређивањем параметара гликорегулације: гликемије, концентрације инсулина у крви, гликозилираног хемоглобина (HbA1c) и израчунавањем НОМА-IR (енгл. *Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance*);
- Испитати концентрације цитокина IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β и C реактивног протеина (CRP) у системској циркулацији.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Узроци и патогенетски механизми прогресије стеатозе јетре у стеатохепатитису и фибрози јетре су недовољно познати. У условима дијете са високим садржајем масти долази до повећања крајњих продуката метаболизма липида и глукозе, који покрећу инфламацију у различитим метаболичким ткивима. Најновија истраживања су такође показала да у мишијем моделу индуковане гојазности, делеција Gal-3 погоршава инфламацију у панкреасу и висцералном адипозном ткиву. Улога Gal-3 у патогенези стеатозе, инфламације и фиброзе јетре у мишијем моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти није проучавана.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње:

Планирано истраживање биће спроведено на мишевима соја C57BL/6, и то: галектин-3 дефицијентним (енгл. knockout, LGALS3^{-/-}), добијеним љубазношћу проф. dr Daniel K. Hsu-a (Department of Dermatology, University of California Davis, School of Medicine, Sacramento, California, USA), и галектин-3 позитивним (енгл. wild-type, WT) мужјацима, старости од 6 до 8 недеља. Све животиње биће одгајане под стандардним условима у виваријумима Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уз приступ води и храни *ad libitum*. Све експерименталне и контролне групе животиња садржаће по 10 мишева. Укупан број животиња потребних за реализацију истраживања је 80 мишева.

Индукција гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a:

Планирани модел индукције гојазности подразумева примену специјалне дијете са високим процентом масти (60% масти, Mucedola, Milano, Italy). Контролне групе животиња биће стављене на стандардну исхрану (10 % масти). Предвиђено трајање индукције је 24 недеље, са тим да ће део експерименталних животиња у 19. недељи примити две дозе стрептозотоцина (65mg/kg телесне масе) у два узастопна дана, са циљем индукције тип 2 Diabetes mellitus-a. Након жртвовања животиња у атмосфери засићеној диетилетром (BETA НЕМ, Београд) предвиђена је изолација јетре, висцералног адипозног ткива из пери-гонадалних депоа и панкреаса за даљу анализу. Крв ће бити сакупљена након жртвовања, пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум ће се изоловати центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнути на -20°C за даљу анализу.

Праћење метаболичких параметара:

Динамика увећања телесне масе и гликемије биће праћена сваке четврте недеље. У пуној крви, добијене пункцијом репне вене након 4h гладовања, биће одређиван ниво глукозе уз помоћ глюкометра (Accu-Chek Performa, Roche, Germany). Серумске концентрације липида (триглицериди, укупни холестерол, HDL, LDL и мокраћна киселина), као и проценат гликозилираног хемоглобина (HbA1c) биће мерени употребом Olympus AU600 chemistry immuno analyzer-a (Olympus, Japan). Концентрација секретованог инсулина наше биће одређивана у серуму уз помоћ ELISA теста (Millipore, MA, USA) према упутству произвођача. Степен инсулинске резистенције тумачиће се на основу израчунате вредности НОМА-IR према формули: концентрација инсулина наше (mU/ml) x гликемија наше (mmol/l) / 22.5.

Одређивање нивоа цитокина у серуму:

Системски нивои IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β и C реактивног протеина (CRP) биће мерени у серуму мишева ELISA методом према унапред утврђеном протоколу (R&D Systems,

Minneapolis, MN, USA).

Изолација ћелија за анализу методом проточне цитометрије (Flow cytometry):

Изолација моноклеара из јетре:

Изолованој јетри биће одстрањена жучна кеса. Изоловано и опрано ткиво јетре биће уситњено маказицама и пропуштено кроз ћелијско сито величине 200 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA), добијени садржај биће центрифугиран на 480 rpm (60g) обртаја са искљученом опцијом наглог кочења („with the off break setting”) 1 минут на собној температури. Супернатант, који садржи интрахепатичне ћелије, биће пребачен у нову епрувету кроз ћелијско сито величине 40 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) а затим центрифугиран на 1433 rpm (480g) обртаја са укљученом опцијом наглог кочења („with the high break setting”) 8 минута на собној температури. Добијени талог биће ресуспендован у хипотоничном пуферу за лизу еритроцита, на собној температури 5 минута, онда ће бити суплементиран са 2ml RPMI 1640 медијума (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% fetal calf serum-a (FCS), а затим центрифугиран на 1433 rpm (480g) са укљученом опцијом наглог кочења 8 минута на собној температури. Коначно, добијени талог биће ресуспендован у 1ml RPMI 1640 медијуму са 10% FCS провучен кроз ћелијско сито величине 40 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и коришћен за даљу анализу.

Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције (СВФ) из висцералног адипозног ткива:

Висцерално адипозно ткиво, биће уситњено и опрано у 3ml PBS-a, биће дигестирано у раствору 1mg/ml колагеназе тип 2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) са 2% bovine serum albumin-a (BSA, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) у PBS-у, 1h на 37°C, биће пропуштено кроз ћелијско сито величине 40 μ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и биће центрифугирано 5 минута на 500g обртаја. Еритроцити у добијеном пелету биће лизирани у хипотоничном пуферу за лизу еритроцита 3 минута на собној температури. Након лизе ћелије СВФ ће бити два пута опране и ресуспендоване у RPMI 1640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% FCS за даљу анализу.

Изолација моноклеара из панкреаса:

Уситњено и опрано ткиво панкреаса биће дигестирано у раствору 2mg/ml колагеназе тип 5 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) у Hanks Balanced Salt Solution-у (HBSS, Sigma-Aldrich, Germany), са 10% FCS на 37°C, 15 минута. Дигестирано ткиво ће механички бити пропуштено кроз 40 μ 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.

Фенотипизација изолованих моноклеарних ћелија:

Изоловане ћелије стромалне васкуларне фракције из јетре, висцералног адипозног ткива и моноклеарне ћелије из панкреасних острваца ће бити обележене флуорохром-коњугованим моноклонским анти-мишјим CD3, CD4, CD8, NK1.1, F4/80, CD11c, CD11b, CD206, Gr-1, IL-13 α 1, Lin coct., Sca-1, CD117 и CD25 антителима (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) или одговарајућим изотипским контролама и инкубиране 30 минута на +4°C. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије ће бити инкубиране 5 h на 37°C у присуству 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-a (PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA), 1 μ g/ml ionomycin-a (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) и 0.8 μ l Golgi Stop-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након инкубације, ћелије ће бити фиксиране и пермеабелизоване употребом BD Cytofix/Cytoperm kit-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележене одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима за IL-13, IL-1 β , TGF- β , IFN- γ , IL-17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Процена степена и природе моноклеарног инфилтрата у панкреасним острвацама и јетри методом имунохистохемије:

Дистрибуција инфламаторних ћелија у циљним ткивима биће праћене микроскопирањем

исечака одговарајућих ткива обојених haematoxylin-ом и eosin-ом, употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером. За даље испитивање фенотипских карактеристика инфилтрисаних ћелија користиће се имунохистохемијско бојење. Ткивни исечци ће бити инкубирани са биотинисаним анти-мишјим F4/80 антителима а визуелизација ће се обавити уз помоћ Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a (Abcam).

Циљана хистолошка бојења:

Формалдехидом фиксирани, парафином калупљени ткивни исечци јетре биће бојени haematoxylin-ом и eosin-ом, Sieriys Red и трихроматским бојењем по Massony, са циљем да се утврди и квантификује дистрибуција инфламаторних ћелија, дегенерација хепатоцита (балон дегенерација) и фиброза. За квантификацију стеатозе биће коришћени криоисечци ткива јетре бојени Oil-Red O методом. Микроскопирање исечака ткива јетре биће одрађено употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером. За дефинисање и квантификовање стеатохепатитиса користиће се скоринг систем, а микроскопирање ће обавити два независна истраживача слепом методом. За квантификацију инфламаторних ћелија и број инфилтрата користиће се следећи скор (нема инфилтрата у видном пољу (увеличање 20x) - 0; 1 инфилтрат - 1+; 2 или више инфилтрата - 2+, дифузни инфилтрата - 3+). Скор од 0 до 4 ће се користити за степен стеатозе, а односи се на број ћелија које у себи садрже маст: (нема масти у ћелијама - 0; $\leq 5\%$ ћелија - 1+; 5-33% ћелија - 2+; 34-66% ћелија - 3+; $\geq 67\%$ ћелија - 4+). Фиброза ће се квантификовати следећим скор системом (одсутна - 0, фокална - 1+, екстензивна *nonbridging* - 2+, *bridging* - 3+, цироза - 4+). Скор дегенерације хепатоцита ће се односити на присуство или одсуство балон дегенерације (одсутна - 0, присутна - 1+). Скор ће бити израчунат укупно за сваки ткивни исечак и упоређен са контролом.

Врста студије

Тип студије према коме ће бити спроведено истраживање у целини је експериментална студија на животињама *in vivo*.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу очекиваних вредности гликемије и телесне масе, добијених у прелиминарно урађеним експериментима. Студијски узорак је израчунат узимајући да је $\alpha=0.05$, а снага студије 0.8 за независни *T* тест, поредећи 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 између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 10 за сваку од група. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни *T* тест или Mann-Whitney test) између две измерене варијабле, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 13.0.

Статистичка обрада

Све добијене вредности биће презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабле по групама, за утврђивање статистичке значајности 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. За тестирање зависности између појединих варијабле користиће се тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање Pearson-овог коефицијента корелације. За обраду података користиће се статистички пакет SPSS 13.0. Статистичка значајност је одређена на $p<0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Тачан узрок NASH -а није познат, ипак зна се да се често јавља код особа са одређеним медицинским стањима као што су гојазност, дијабетес и инсулинска резистенција. Патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена. Аблација гена за Gal-3 индукује убрзан развој гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-а у условима повећаног енергетског уноса дијетом са високим садржајем масти. У условима дијете са високим садржајем масти долази до повећања крајњих продуката метаболизма липида и глукозе, који покрећу инфламацију у различитим метаболичким ткивима. Могућа протективна улога Gal-3 у развоју стеатозе и следствене инфламације у јетри (стеатохепатитиса) огледа се у томе што овај молекул има улогу у везивању и одстрањивању крајњих продуката метаболизма глукозе и липида, као и ендотоксина који су окидачи хроничне инфламације у метаболичким ткивима. Са друге стране када је процес фиброгенезе у јетри у питању, очекујемо да делеција гена за Gal-3 блокира активацију миофибробласта, и тиме следствено процес фиброзе. Значај предложеног истраживања има за циљ расветљавање механизма настанка стеатохепатитиса у условима гојазности и тип 2 дијабетеса, а посебно улоге галектина-3 у овим процесима, што може имати значај у креирању нових терапијских приступа.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Користећи комплементарне експерименталне приступе у мишева генетски дефицијентних у експресији галектина-3 и одговарајућих контрола, биће испитана улога галектина-3 у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре након индукције болести применом дијете са високим садржајем масти. Планираним истраживањем треба испитати улогу галектина-3 у инфламацији повезаној са настанком стеатозе и фиброзе јетре, као и дефинисати могући механизам настанка стеатохепатитиса.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже Проф. др Наду Пејновић, која је ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија. Проф. др Нада Пејновић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална Интерна медицина

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан
3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
4. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. Др Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник за ужу научну област Биологија – Имунологија, Института за биолошка истраживања “Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан

Закључак и предлог Комисије

Др мед. Илија Јефтић асистент у настави на предмету Патолошка физиологија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, на основу досадашње стручне, научне и педагошке активности испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука и законом о универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Кандидат је овладао целуларним, молекуларним и хистолошким техникама савремених медицинских истраживања које су неопходне за израду ове теме о улози галектина-3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Илије Јефтић, под називом " **Улога галектина-3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности** " и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник

2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан

3. **Проф. др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

4. **Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

5. **Др Станислава Стошић-Грујичић**, научни саветник за ужу научну област Биологија – Имунологија, Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду, члан
