

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО- НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-713/22, од 13.07.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Ивице Петровића, под називом:

„Улога галектина-3 у патофизиологији бета ћелија панкреаса“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Александар Љ. Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, председник
2. **Проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
3. **Академик Проф. др Небојша М. Лалић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат др медицине Ивица Петровић, рођен је 29.09.1985. године у Краљеву, где је завршио основну и средњу школу. Интегрисане академске студије медицине на Медицинском факултету у Крагујевцу уписао је школске 2004/2005. године, а завршио их на истом факултету у децембру 2011. године, са просечном оценом 8,97 (осам и 97/100), чиме је стекао стручно звање доктора медицине. По завршетку основних студија обавио је приправнички стаж и положио стручни испит за доктора медицине.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и клиничка интерна медицина - подподручје ендокринологија, уписао је школске 2012/2013. године. Усмени докторски испит је положио 2015. године. Од 2013. године запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где до данас обавља послове сарадника у настави у звању асистента за ужу научну област Патолошка

физиологија. Од априла 2014. године на специјализацији из Интерне медицине. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Улога галектина-3 у патофизиологији бета ћелија панкреаса“

Предмет: Предмет овог истраживања представља испитивање улоге галектина-3 у патогенези шећерне болести у експерименталним мишићим моделима

Хипотеза: Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса резултира тежим обликом типа 1 и типа 2 шећерне болести. Примена инхибитора галектина-3 делује протективно и спречава развој болести у експерименталном моделу типа 1 шећерне болести код мишева соја NOD (engl. non-obese diabetic).

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M52 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Petrovic I, Petrovic S, Vujanac K, Petrovic M, Lazic Z. Clinical Presentation Of The Abuse Of Insulin: Hypoglycaemic Coma And Aspiration Pneumonia In Non-Professional Bodybuilders. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research

DOI: 10.1515/SJECR-2015-0049

M52

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Шећерна болест представља растући здравствени проблем у свету са преко 300 милиона оболелих са тенденцијом повећања броја оболелих у свим старосним узрастима, а посебно забриљава повећање броја оболелих код младих особа. Савремен начин живота са неадекватним начином исхране и недостатком физичке активности, представљају главне факторе у настанку гојазности, која претходи поремећају метаболизма глукозе и настанку доминатне форме шећерне болести, типа 2 шећерне болести. У патогенези типа 1 шећерне болести, главну улогу има аутоимунски процес усмерен ка β ћелијама панкреасних острваца. Овај аутоимунски процес карактерише се настанком аутоимунске инфламације посредоване Th1/Th17 лимфоцитима, активацијом макрофага и продукцијом проинфламаторних цитокина који индукују апоптозу β ћелија, смањење масе β ћелија у острвцима и смањење продукције инсулина. У патогенези типа 2 шећерне болести, главну улогу има настанак гојазности са метаинфламацијом у масном ткиву, која је праћена стварањем проинфламацијских цитокина и повећањем резистенције периферних ткива на инсулин, што води настанку компензаторне хиперинсулинемије, инфламације у самим

острвцима са инфилтрацијом макрофагама, оштећењем β ћелија, стресом ендоплазматског ретикулума β ћелија и настанком апоптозе и/или дедиференцијације β ћелија. Галектин-3 представља мултифункционални лектин који има значајно место у регулацији ћелијског циклуса, апоптози ћелија, метастатског ширења тумора, ћелијској активацији и пролиферацији. У зависности од ткива и патофизиолошког процеса, галектин 3 може имати проинфламацијску или антиинфламацијску улогу. Такође је познато да галектин-3 утиче и на метаболизам глукозе. Постоји значајан број студија које су се бавиле проучавањем поремећаја метаболизма глукозе код галектин-3 дефицијентних мишева и мишева дивљег соја али су и оне донеле различите закључке. Поједине студије су показале да галектин-3 дефицијентни мишеви и на стандардној исхрани, у поређењу са мишевима дивљег соја имају повишен степен системске инфламације и инсулинске резистенције које су праћене повишеним вредностима гликемија наше. Друге, које су се бавиле испитивањем разлика између галектин-3 дефицијентних мишева и мишева дивљег соја на исхрани богатој мастима, показале су још израженији поремећај степена гликорегулације праћен повишеним вредностима гликозилираног хемоглобина, инсулинемијом и вишим степеном метаинфламације код галектин-3 дефицијентних мишева. Две студије су показале да галектин-3 дефицијентни мишеви имају боље метаболичке параметре, ниже вредности гликемија, бољу инсулинску сензитивност, ниже концентрације инсулина и нижу телесну масу у односу на мишеве дивљег соја. Имајући напред изнесено у виду, неопходна су даља испитивања ради откривања ћелијских и молекуларних механизма преко којих галектин-3 утиче на метаболизам глукозе и развој шећерне болести.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Ова студија би требало да по први пут директно, *in vivo*, испита да ли и на који начин појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, мишева са трансгено појачаном експресијом, утиче на патогенезу настанка шећерне болести типа 1 и типа 2 као и ефекат примене инхибитора галектина-3 у настанку типа 1 шећерне болести код NOD мишева. Резултати ове студије могу бити значајни у смислу даљих терапијских интервенција и примене евентуалних лекова у циљу спречавања настанка шећерне болести.

Циљ студије

Основни циљ истраживања је да се испита ефекат галектина-3 на оштећење β ћелија панкреаса у експерименталном мишјем моделу.

У складу са основним циљем експериментални задаци су следећи:

1. Утврдити ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у β ћелијама панкреасних острваца на патогенезу типа 1 шећерне болести индукованом интраперитонеалном применом понављаних ниских доза стрептозотоцина праћењем: вредности гликемија, телесне тежине, гликозурије, инсулинемије, функционалног статуса β ћелија, аутоимунске инфилтрације у острвцима и периферним лимфним чворовима.
2. Утврдити ефекат примене инхибитора галектина-3 на патогенезу типа 1 шећерне болести NOD мишева праћењем: вредности гликемија, телесне тежине, гликозурије, инсулинемије, аутоимунске инфилтрације у острвцима и периферним лимфним чворовима.
3. Утврдити ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у β ћелијама панкреасних острваца на патогенезу типа 2 шећерне болести индуковане исхраном богатом мастима праћењем: вредности гликемија, телесне тежине, степена инсулинске резистенције, вредности инсулинемија, липидемија, вредностима гликемија у интраперитонеалном тесту оптерећења глукозом, инфламације у острвцима и периферним лимфним чворовима.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашње студије су испитивале ефекат галектина-3 у патогенези шећерне болести на галектин-3 дефицијентним мишевима и мишевима дивљег соја, али без испитивања ефекта на мишевима са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса и NOD мишевима.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија на животињама, *in vivo* и *ex vivo* на ћелијама изолованим из експерименталих животиња.

Експерименталне животиње

Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја C57Bl/6, мушког пола, старости 12 недеља које се узгајају у виваријуму Центра за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, добијени из Швајцарске у оквиру SCOPES пројекта (IZ73Z0_152407), као и NOD мишеви мушког пола. Чување животиња ће бити према прописаним узгојним условима (храна и вода за пиће *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла, температура ваздуха и мењање простирке) све до завршетка експеримента. Целокупан рад са животињама у овој студији ће се обављати уз одобрење Етичке Комисије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Узорковање

Са циљем утврђивања генотипа (код мишева дивљег соја и мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним острвцима), јединке ће се након урађеног PCR и одређивања генотипа мишева, бити одвајане у кавезе по групама, тако да ће бити формирано шест огледних група, док ће NOD мишеви бити распоређени у две огледне групе:

Испитивање типа 1 шећерне болести код трансгених и мишева дивљег соја:

1. прву групу ће чинити C57Bl/6 мишеви дивљег соја, мушког пола, на стандардној исхрани, којима ће бити индукован тип 1 шећерне болести, интраперитонеалном применом пет узастопних малих доза стрептозотоцина (40mg/kg)
2. другу групу ће чинити C57Bl/6 мишеви, мушког пола, са трансгеном појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреасних острваца, на стандардној исхрани, којима ће бити индукован тип 1 шећерне болести интраперитонеалном применом пет узастопних малих доза стрептозотоцина (40 mg/kg)

Испитивање типа 2 шећерне болести код трансгених и мишева дивљег соја:

3. трећу групу ће чинити C57Bl/6 мишеви, мушког пола, дивљег соја на стандардној исхрани у трајању од 16 недеља
4. четврту групу ће чинити C57Bl/6 мишеви, мушког пола, дивљег соја на исхрани храном богатом мастима у трајању од 16 недеља
5. пету групу ће чинити C57Bl/6 мишеви, мушког пола, са трансгеном појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреасних острваца, на стандардној исхрани у трајању од 16 недеља
6. шесту групу ће чинити C57Bl/6 мишеви, мушког пола, са трансгеном појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреасних острваца, на исхрани храном богатом мастима у трајању од 16 недеља

Испитивање ефекта галектина-3 на патогенезу тип 1 шећерне болести NOD мишева:

7. седму групу ће чинити NOD мишеви, мушког пола на стандардној исхрани
8. осму групу ће чинити NOD мишеви, мушког пола којима ће у почетној фази развоја болести бити дат инхибитор галектина-3

Индукција шећерне болести тип 1 код трансгених мишева и мишева дивљег соја:

Шећерна болест тип 1 ће се индуковати убризгавањем стрептозотоцина интраперитонеално у дози од 40mg/kg, раствореног у цитратном пуферу (pH=4,8), пет узастопних дана.

Индукција шећерне болести тип 2 код трансгених мишева и мишева дивљег соја:
Шећерна болест тип 2 ће се индуковати давањем животињама хране богате мастима (eng. HFD 60% калорија из масти) у трајању од 16 недеља.

Варијабле које се мере у студији

PCR генотипизација. Непосредно по рођењу мишевима ће бити узоркован делић ткива (део ушне шкољке) ради генотипизације. Методом ланчане реакције полимеризације одредиће се трансгена експресија галектина-3 ради одређивања експерименталних група мишева.

Мерење телесне масе, гликемије. Динамика увећања телесне масе и гликемије биће мерена на 14 дана од почетка експеримента. Ниво глукозе у пуној крви наше добија се пункцијом репне вене након 4h гладовања, а потом се кап крви наноси на траку за мерење гликемије (Accu-Chek Performa, Roche, Germany) сваком мишу појединачно.

Мерење гликемија током интраперитонеалног ГТТ. Ниво глукозе у пуној крви наше добија се пункцијом репне вене након 16h гладовања, а потом се кап крви наноси на траку за мерење гликемије (Accu-Chek Performa, Roche, Germany). Вредности гликемија ће се пратити у 0, 15, 30, 60, 90 и 120 минути, након стимулације глукозом у концентрацији од 1g/kg, апликоване интраперитонеално сваком мишу појединачно.

Одређивање серумског нивоа цитокина. Вредности про- и анти- инфламацијских цитокина, инсулина и биће одређена стандардном ELISA техником, коришћењем ELISA сетова специфичних за мишје цитокине (R&D Systems Minneapolis, MN), и инсулин (Millipore, MA, USA) према упутствима произвођача.

Изолација панкреасних острваца. Након жрвовања животиња, панкреас ће бити узоркован ради изолације панкреасних острваца и њиховог даљег третирања и испитивања коришћењем раније успостављеног протокола.

Имунохистохемијска анализа морфологије панкреасних острваца. Исечци ткива у парафинским калупима користиће се за хистолошку анализу бојењем хематоксилин-еозином ради одређивања степена инсулитиса и фенотипа инфилтрисаних имунских ћелија имунохистохемијским методама.

Анализа проточном цитометријом. Анализираће се експресија галектина-3, проценат апоптотских β ћелија /Annexin V kit/, проценат инсулин позитивних β ћелија, заступљеност M1 и M2 макрофага, субпопулација T лимфоцита и дендритских ћелија.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је на основу студије сличног дизајна (14) из 2016. године, коришћењем статистичког програма G*Power 3.1.7. На основу гликемије наше мишева дивљег соја, чија је просечна вредност на стандардној исхрани била 14.11 mmol/l уз SD 1.486 mmol/l и SE 0.47mmol/l, уз просечне вредности гликемије, мишева дивљег соја,

којима је индукована шећерна болест тип 1 интраперитонеалним давањем већег броја малих доза стрептозотоцина, пет узастопних дана била 22.23 mmol/l уз SD 3.447 mmol/l и SE 1.09 mmol/l, потребна величина узорка за ниво значајности $\alpha=0,05$ и статистичку моћ теста $1-\beta$ од 95%, поређењем група у оба смера, израчуната је потребна величина узорка од 5 експерименталних животиња по групи. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student-ов t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе мишева, са снагом студије 95%.

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 22. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати нормалност расподеле добијених вредности. Уколико вредности буду имале нормалну расподелу користићемо параметарски Student's t тест, док уколико расподела не буде нормална примениће се непараметарски Mann-Whitney тест. Резултати ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички високо значајна разлика када је $p < 0,01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Трансгено појачана експресија галектина-3 резултира тежим обликом тип 1 и тип 2 шећерне болести. Примена инхибитора галектина-3 делује протективно и спречава развој болести у експерименталном моделу типа 1 шећерне болести NOD мишева.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овој докторској дисертацији ће *in vivo* методама на експерименталним животињама и *ex vivo* методама на ћелијама изолованим из експерименталних животиња, биће испитан ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у β ћелијама, у експерименталном мишјем моделу, у патогенези шећерне болести, као и ефекат примене инхибитора галектина-3 у патогенези шећерне болести код NOD мишева. У експерименталном моделу типа 1 шећерне болести, биће праћени: метаболички параметри (тенденција кретења телесне масе и гликемије наше), уз одређивање серумских нивоа инсулина, цитокина као и имунихистохемијску анализу морфологије панкреасних острваца са анализом модулације имунског одговора проточном цитометријом. У експерименталном моделу типа 2 шећерне болести, биће праћени: метаболички параметри (тенденција кретења телесне масе, маса висцералног масног ткива, гликемије наше као и вредности гликемије у различитим временима након оптерећења глукозом, интраперитонеалним глукоза толеранс тестом), уз одређивање серумских нивоа инсулина, цитокина као и имунихистохемијску анализу морфологије панкреасних острваца са анализом модулације имунског одговора проточном цитометријом. Резултати ове студије могу бити значајни у

смислу даљих терапијских интервенција и примене евентуалних нових лекова у циљу спречавања настанка шећерне болести.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже др **Нада Пејновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област патолошка физиологија. 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

Проф.др Нада Пејновић има дугогодишње искуство у дизајнирању и спровођењу истраживања у области имунологије и експерименталне дијабетологије. Учествовала је на бројним пројектима и објавила читав низ радова који су у вези са темом докторске дисертације, међу којима су и:

1. **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
2. Jovicic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, **Pejnovic N**. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. *PLoS One* 2015; 10(7):e0134089.
3. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, **Pejnovic N**. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33 Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Molecular Medicine* 2015 22;21:453-65.
4. Lukic ML, **Pejnovic N**, Lukic A. New insight into early events in type 1 diabetes: role for islet stem cell exosomes. *Diabetes* 2014; 63(3):835-837.
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. N. Zdravkovic, S. Pavlovic, V. Zdravkovic, **N.Pejnovic**, N. Arsenijevic, M.L. Lukic. ST2 gene-deletion reveals a role of Foxp3+ regulatory T cells in diabetes modulation in BALB/c mice. *Translational Research* 2013; 161(2):118-129.
7. **Pejnovic N**. Galectin-3 in obesity and type 2 diabetes. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16 (4): 273-280. Expert opinion
8. G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, **N. Pejnovic**, N. Arsenijevic, D.K. Hsu, M.L. Lukic. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor

progression. Immunol Res 2012; 52(1-2):100-110.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Експериментална и клиничка интерна медицина, подподручје ендокринологија

5. Научна област чланова комисије

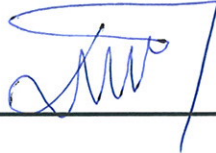
1. **Проф. др Александар Љ. Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Патолошка физиологија, председник
2. **Проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан
3. **Академик Проф. др Небојша М. Лалић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Ивице Петровић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита улогу галектина-3 у патофизиологији β ћелија панкреаса у експерименталним мишјим моделима шећерне болести
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме и одобри израду докторске дисертације кандидата др Ивице Петровића, при чему је неопходно кориговати назив „Улога галектина-3 у патофизиологији бета ћелија панкреаса“ у „Улога галектина-3 у патофизиологији β ћелија панкреаса“.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. **Проф. др Александар Љ. Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Патолошка физиологија, председник



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



3. **Академик Проф. др Небојша М. Лалић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан



У Крагујевцу, 17.07.2017.