

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

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

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-10274/3-6 од 28.11.2012. год, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Јелене Пантић** под називом:

**" Галектин-3 у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a"**

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

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Нада Пејновић, редовни професор за ужу научну област Патолошка физиологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" 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. Јелена Пантић**, 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**

Јелена Пантић рођена је 25. 08. 1977. године у Крушевцу. Основну школу и Гимназију (природно-математички смер) завршила је у Крушевцу. Медицински факултет Универзитета у Београду, уписала је школске 1995/96. године, а дипломирала 30. септембра 2002. године са просечном оценом 8,54 и тиме стекла звање доктора медицине. Обавила је општи лекарски стаж на Војно-медицинској академији у Београду и положила стручни испит 2003. године. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, уписала је 2008. године и положила усмени докторски испит у новембру 2010. године са оценом 9. Од јануара 2012. године до данас, ради као сарадник у настави на Катедри за Микробиологију и имунологију, Факултета медицинских наука Универзитета у

Крагујевцу. У школској 2012/2013. години уписала специјалистичке студије из Медицинске микробиологије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

## **Б. Научно истраживачки рад**

Кандидаткиња, др Јелена Пантић, се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. Учесник је на Јуниор пројектима Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

1. „Улога *IL-33/ST-2* сигналног пута у спектру метаболичких дисфункција и инфламацији испитивана на индукованим моделима *Diabetes mellitus*-а тип 2
2. „Испитивање улоге Галектина-3 у метаболичкој дисфункцији и инфламацији у мишићем моделу индуковане гојазности и типа 2 *Diabetes mellitus*-а применом дијете са високим садржајем масти“

Стекла је потребно искуство за организацију и реализацију сличних пројеката.

Објавила је један рад у целости, као први аутор, у часопису од националног значаја и више сажетака са међународних и домаћих научних скупова. По том основу, а у складу са чланом 177. Статута Факултета, остварила је 7,2 бода.

## **В. Подаци о објављеним радовима**

В.1. Радови објављени у научним часописима међународног значаја (категорија М20)

1.1. Conlon JM, Mechkarska M, **Pantic JM**, Lukic ML, Coquet L, Leprince J, Nielsen PF, Rinaldi AC. An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog *Discoglossus sardus* (Alytidae). *Peptides*. 2012 Dec 20. doi:pii: S0196-9781(12)00496-2. 10.1016/j.peptides.2012.12.012. **(М22-5 бодова)**

В.2. Зборници међународних научних скупова (категорија М30)

2.1. Pejnovic N, **Pantic J**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Milovanovic M, Zdravkovic N, Djukic A, Arsenijevic N, Lukic M. Gal-3 Deficiency Accelerates Diet-induced Obesity and Increases NLRP3 Inflammasome and IL-1 $\beta$  expression in Pancreatic Islets in Mice. Abstract book, 10th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference, June 9-13, 2012. **(М34-0,5 бодова)**

В.3. Часописи националног значаја (категорија М50)

3.1. **Pantic J**, Volarevic V, Djukic A. Experimental models of diabetes mellitus. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2011; 12(1):29-35. **(М52-1,5 бод)**

В.4. Зборници скупова националног значаја категорија (М60)

4.1 **Пантић Ј.** Рационална терапија остеопорозе-значај и превенција настанка *fragility fractures*. Књига сажетака, Други национални конгрес рационалне терапије у медицини 7-8. новембра 2009. године. Рационална терапија 2009; 1(2): 64-65. **(М64-0,2 бода)**

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

### Наслов:

" Галектин-3 у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a"

### Предмет:

Хронична инфламација у висцералном адипозном ткиву и острвцима ендокриног панкреаса игра кључну улогу у развоју гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a. Галектин-3 (Gal-3), галактозид-везујући лектин, учествује у деградацији и уклањању штетних метаболичких продуката, који вероватно различитим механизмима покрећу инфламацију у условима повећаног енергетског уноса. Планираним истраживањем треба испитати улогу Gal-3 у инфламацији повезаној са настанком гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a, као и дефинисати могући механизам настанка инфламације.

У Gal-3 дефицијентних (LGALS3<sup>-/-</sup>) и Gal-3 позитивних мишева соја C57BL/6, гојазност и тип 2 Diabetes mellitus-a биће индуковани применом дијете са високим садржајем масти (60%) у трајању 10-18 недеља. Метаболички параметри развоја болести биће праћени сваке друге недеље. Након индукције, NKT ћелије ће бити активирани интраперитонеалном апликацијом  $\alpha$ -галактозилцерамида ( $\alpha$ GalCer). Параметри инфламације (степен инфилтрације, фенотип инфилтрованих ћелија и продукција цитокина) биће одређивани у циљним ткивима и изолованим перитонеалним макрофагима након жртвовања методом проточне цитометрије, имунохистохемије/имунофлуоресценце, трансфекције siRNA и Western blot методом. Функционалне карактеристике изолованих перитонеалних макрофага биће испитиване *in vitro* у култури ћелија, након стимулације липополисахаридом, засићеним масним киселинама (палмитат), глукозом или водоник-пероксидом. Нивои цитокина у серуму и супернатантима биће одређивани ELISA тестом.

Аблација гена за Gal-3 индукује убрзан развој гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a у условима повећаног енергетског уноса. Gal-3 дефицијентни мишеви имају увећану телесну масу, количину висцералног адипозног ткива, гликемију наше и инсулинемију, као и пораст концентрације системских маркера инфламације. Централно место настанка инфламације је висцерално адипозно ткиво где долази до ране инфилтрације тип 1 Т и NKT лимфоцита, праћене значајним смањењем заступљености регулаторних Т лимфоцита. Као последица настаје поларизација макрофага у смеру про-инфламаторног М1 фенотипа, уз значајно смањену заступљеност алтернативно активираних М2 макрофага. У исто време ћелије моноцитно/макрофагне лозе инфилтришу острвца ендокриног панкреаса и доводе до појаве инсулитиса. У циљним ткивима и инфилтришућим ћелијама расте експресија крајњих продуката метаболизма липида и глукозе, који вероватно различитим механизмима покрећу инфламацију. Највероватнији механизам настанка инфламације је рана активација NLRP3 инфлазома у инфилтришућим макрофагима од стране штетних метаболита и следствена каспаза-1 посредована продукција IL-1 $\beta$ . Такође, у инфилтришућим ћелијама се повећава експресија фосфорилисаног NF $\kappa$ B транскрипционог фактора што је могући додатни механизам у настанку инфламације.

Одсуство Gal-3 убрзава настанак гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a индукцијом инфламације у висцералном адипозном ткиву и острвцима ендокриног панкреаса у условима повећаног енергетског уноса исхраном богатом мастима, што указује на важан протективни ефекат Gal-3 у патогенези ових обољења.

**Хипотеза:** Одсуство Gal-3 подстиче инфламацију и убрзава настанак гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a.

### 2.3. Подобност кандидата

Кандидат, Јелена Пантић положила је усмени докторски испит 03.11.2011. године са оценом 9 (девет). У току студија објавила је један рад у научном часопису националног значаја као први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Хронична инфламација ниског степена (енгл. low-grade inflammation) у висцералном адипозном ткиву има централну улогу у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a. Настаје као последица дејства бројних штетних метаболичких продуката који настају у условима повећаног енергетског уноса. У нормалним условима, у висцералном адипозном ткиву су присутне бројне ћелије урођеног и стеченог имунског одговора које у међусобној комуникацији одржавају метаболичку хомеостазу. Патогенеза гојазности иницијално је повезана са повећаном инфилтрацијом CD8 и CD4 Th1 лимфоцита, као и смањењем броја Т регулаторних лимфоцита, што све заједно индукује поларизацију макрофага у смеру M1 фенотипа. M1 макрофаги продукују проинфламаторне цитокине интерлеукин (IL)-1 $\beta$  и фактор некрозе тумора (енгл. tumor necrosis factor, TNF) –  $\alpha$ , који имају снажан ефекат на развој инсулинске резистенције. Поред конвенционалних ћелија имунског система (Т и В лимфоцити и макрофаги), новија истраживања указују на могући значај NKT ћелија у контроли метаболичке хомеостазе. У зависности од контекста (тип липидних антигена, врста ћелијске субпопулације, ткивна микросредина) NKT ћелије могу да стимулишу или супримирају стечени имунски одговор и усмере га у правцу Th1 или Th2 имунског одговора, продукцијом интерферона (IFN)- $\gamma$ , односно IL-4 и IL-13. Новија студија је показала да NKT ћелије, активирине применом  $\alpha$ -галактозилцерамида ( $\alpha$ GalCer), повећаном продукцијом IL-4 и вероватно IL-13, стимулишу поларизацију макрофага у смеру M2 фенотипа и смањују глукозну интолеранцију. Уз то, најновија истраживања су указала на значај мононуклеарне инфилтрације панкреасних острваца у процесу прогресивне деструкције  $\beta$  ћелија. Такође, серумски ниво про-инфламаторних цитокина као што су IL-6, IL-1 $\beta$  и С реактивни протеин (CRP), корелирају са степеном апоптозе  $\beta$  ћелија, указујући на значај инфламације у панкреасним острвцима у патогенези типа 2 Diabetes mellitus-a.

Молекулски механизми настанка инфламације у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a још увек су недовољно познати. NF $\kappa$ B (енгл. Nuclear factor- $\kappa$ B) припада фамилији транскрипционих фактора укључених у регулацију експресије про-инфламаторних гена. Различити ћелијски стимуланси, укључујући глукозу и слободне масне киселине, активирају NF $\kappa$ B и подстичу инфламацију у процесу настанка инсулинске резистенције. IL-1 $\beta$  се сматра једним од кључних медијатора у нутријентима индукованом оштећењу секреторне функције и следственој апоптози  $\beta$  ћелија. Механизми којима нутријенти (глукоза, слободне масне киселине) индукују продукцију IL-1 $\beta$  су комплексни. Најновија истраживања су показала да засићене масне киселине, као један од метаболичких продуката, путем активације NLRP3 (енгл. NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3) инфламазома и последичног ослобађања активне каспазе-1, индукују продукцију активног IL-1 $\beta$  (12). Додатно је показано да NLRP3 дефицијенти мишеви не развијају гојазност и инсулинску резистенцију индукованих применом дијете са високим садржајем масти.

Галектин-3 (Gal-3) је члан фамилије  $\beta$ -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације (цитоплазматска, нуклеарна, мембранска) испољава своју мултифункционалност у процесима инфламације, апоптозе, канцерогенезе и вероватно различитим процесима регулације метаболичке хомеостазе. Досадашњим истраживањима делеција гена за Gal-3 доведена је у везу са убрзаном прогресијом дијабетесних компликација као што су експериментални гломерулонефритис, атеросклероза и неалкохолна стеатоза јетре, указујући на могући протективни ефекат Gal-3 у метаболичким дисфункцијама и инфламацији ниског степена која је у основи патогенезе гојазности и типа 2 Diabetes mellitus-a. Један од могућих механизма протективног ефекта Gal-3 везан је за његову функцију рецептора за крајње продукте метаболизма глукозе (енгл. advanced glycation end-products, AGE) и липида (енгл. advanced lipoxidation endproducts, ALE), њиховој деградацији и уклањању из циркулације у условима повећаног флукса ових метаболита, који настаје као последица енергетског дисбаланса организма. Претпоставка је да у одсуству Gal-3 расте ниво ових молекула, као и експресија PRR (енгл. pattern recognition receptor) за AGE (RAGE) који активира ћелије имунског система и подстиче продукцију про-инфламаторних медијатора. Такође је показано да RAGE индукује активацију ћелија стеченог имунског одговора и контролише поларизацију Т лимфоцита у смеру Th1 имунског одговора. Такође је показано да ћелије панкреасних острваца, изложене цитотоксичном дејству IL-1 $\beta$  in vitro, повишено експримирају Gal-3 који има протективну улогу у процесу оштећења ћелија острваца.

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

### **. Главни циљеви испитивања:**

1. Испитати улогу Gal-3 у патогенези гојазности и инсулинске резистенције у мишијем моделу применом дијете са високим садржајем масти;
2. Дефинисати могући механизам настанка инфламације ниског степена, како у циљним ткивима, тако и на системском нивоу, у зависности од присуства или одсуства Gal-3;
3. Испитати улогу NKT ћелија у патогенези гојазности и инсулинске резистенције у присуству или одсуству Gal-3 у мишева на дијети са високим садржајем масти.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

- Испитати утицај Gal-3 на развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести;
- Испитати утицај Gal-3 на развој инсулинске резистенције одређивањем параметара гликорегулације: гликемија и концентрација инсулина у крви, гликозилирани хемоглобин (HbA1c), HOMA-IR (енгл. Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance);
- Испитати системске маркере инфламације одређивањем концентрације CRP-a, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-10, IL-13 у серуму;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву;
- Испитати присуство и степен инфламације, као и фенотипске и функционалне карактеристике инфилтрованих ћелија у панкреасна острваца;

- Испитати ефекат активације NKT ћелија на развој гојазности и контролу гликорегулације, као и њихов утицај на параметре инфламације у циљним ткивима и на системском нивоу у зависности од присуства или одсуства Gal-3 на две врсте исхране;
- Испитати улогу крајњих продуката метаболизма глукозе и липида (AGE, ALE) у настанку инфламације у присуству или одсуству Gal-3, мерењем њихове експресије у висцералном адипозном ткиву и острвцима ендокриног панкреаса;
- Утврдити везу између Gal-3 и активације NLRP3 инфлазома и следствене продукције IL-1 $\beta$ , као могућег механизма настанка инфламације, мерењем експресије NLRP3 инфлазома, каспазе-1 и IL-1 $\beta$  у ткивима *in vivo*, као и *in vitro* на стимулираним ћелијама;
- Утврдити везу између Gal-3 и активације NF $\kappa$ B као могућег механизма настанка инфламације, мерењем експресије укупног и фосфорилисаног NF $\kappa$ B у ткивима *in vivo*, као и *in vitro* на стимулираним ћелијама;

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Галектин-3 (Gal-3), галактозид-везујући лектин, учествује у деградацији и уклањању штетних метаболичких продуката, који вероватно различитим механизмима покрећу инфламацију у условима повећаног енергетског уноса. Улога Gal-3 у патогенези настанка гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-а до данас није проучавана. Планираним истраживањем требало би одговорити на питање колика је и каква улога Gal-3 у модификовању метаболичког и имунског баланса циљних ткива и организма у целини у мишијем моделу гојазности и Diabetes mellitus-а тип 2 добијеном применом дијете са високим садржајем масти.

## 2.7. Методе истраживања

### Експерименталне животиње:

Планирано истраживање биће спроведено на мишевима соја C57BL/6, и то: галектин-3 дефицијентним (енгл. knockout, LGALS3<sup>-/-</sup>), добијеним љубазношћу проф. др 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 6 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 20 мишева. Укупан број животиња потребних за реализацију истраживања је 160 мишева.

### Индукција гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-а:

Планирани модел индукције гојазности и типа 2 дијабетеса подразумева примену специјалне врсте дијете са високим процентом масти (60% масти, Mucedola, Milano, Italy). Контролне групе животиња биће стављене на исхрану са ниским процентом масти (3% масти, Mucedola, Milano, Italy). Предвиђено трајање индукције је 10-18 недеља. За потребе испитивања функционалних карактеристика NKT ћелија, након индукције мишевима ће бити апликован  $\alpha$ GalCer у дози 40 $\mu$ g/kg телесне масе, у 500 $\mu$ l физиолошког раствора, интраперитонеално, четвртог и другог дана пре жртвовања. Контролним групама животиња биће апликован физиолошки раствор у истом волумену.

Након жртвовања животиња у атмосфери засићеној диетилетром (BETA НЕМ, Београд) предвиђена је изолација висцералног адипозног ткива из пери-гонадалних депоа, слезине, панкреаса, пара-панкреатичних лимфних чворова и јетре 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  $-20^{\circ}\text{C}$  за даљу анализу.

#### **Праћење метаболичких параметара:**

Динамика увећања телесне масе и гликемије биће праћена сваке друге недеље. Ниво глукозе у пуној крви наше, добијене пункцијом репне вене након 4h гладовања, биће одређиван уз помоћ глюкометра (Accu-Chek Performa, Roche, Germany). Серумске концентрације липида (триглицериди, укупни холестерол, HDL, LDL и acidum uricum), 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 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-17 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 ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива:

Висцерално адипозно ткиво, уситњено и опрано у 3ml PBS-а, 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  $37^{\circ}\text{C}$ , пропуштено кроз ћелијско сито величине 40 $\mu\text{m}$  (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и центрифугирано 5 минута на 500xg обртаја. Еритроцити у добијеном пелету биће лизирани erythrocyte lyses hypotonic buffer-ом (0.155 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) 3 минута на собној температури. Након лизе ћелије SVF ће бити два пута опране и ресуспендоване у RPMI 640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% fetal calf serum-a (FCS) за даљу анализу.

Изолација спленоцита:

Механичким пропуштањем ткива слезине кроз ћелијско сито величине 40 $\mu\text{m}$  (BD Biosciences San Jose, CA, USA) добиће се једноћелијска суспензија. Након лизе еритроцита erythrocyte lyses hypotonic buffer-ом (0.155 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) 3 минута на собној температури, ћелије ће бити опране и ресуспендоване у RPMI 640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% FCS за даљу анализу.

Изолација мононуклеара из панкреаса:

Уситњено и опрано ткиво панкреаса биће дигестирано у раствору 2mg/ml колагеназе тип 5 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) у Balanced Salt Solution-у (HBSS, Sigma-Aldrich, Germany), са 10% FCS на  $37^{\circ}\text{C}$ , 15 минута. Дигестирано ткиво ће механички бити пропуштено кроз 40 $\mu\text{m}$ -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 мононуклеарних ћелија:**

Изоловане ћелије стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива, мононуклеарне ћелије из панкреасних острваца и слезине ће бити обележене флуорохром-коњугованим моноклонским анти-мишјим CD3, CD4, CD8, NK1.1, CD44, CD62L, CD25, F4/80, CD11c, CD11b и CD206 антителима (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) или одговарајућим изотипским контролама и инкубиране 30 минута на  $+4^{\circ}\text{C}$ . За интрацелуларно

бојење изоловане ћелије ће бити инкубирани 5 h на 37°C у присуству 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-a (PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA), 1 µg/ml ionomycin-a (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) и 0.8µl Golgi Stop-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након инкубације, ћелије ће бити фиксирани и пермеабилizовани употребом BD Cytofix/Сytoperm kit-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележене одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима за FoxP3 (на неактивираним ћелијама), IFN-γ, TNF-α, IL-17, IL-4, IL-10, IL-5 и IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). За испитивање интрацелуларне експресије NLRP3 инфлазома, IL-1β, укупног и фосфорилисаног NFκB, изоловане ћелије из ткива и *in vitro* стимулирани перитонеални макрофаги ће бити фиксирани и пермеабилizовани употребом BD Cytofix/Сytoperm kit-a и обележени зечјим анти-мишјим NLRP3, IL-1β, NFκB (phospho S536), NFκB p65 антителима (Abcam, Cambridge, UK) и одговарајућим секундарним анти-IgG антителом PE-Cy 5.5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Експресија мембранских и интрацелуларних ћелијских маркера биће анализирана употребом FACSCalibur flow cytometer-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### **Процена степена и природе мононуклеарног инфилтрата панкреасних острваца, висцералног адипозног ткива и јетре методом имунохистохемије:**

Дистрибуција инфилтришућих 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 метод двоструког имунохистохемијског бојења. Након инкубације са биотинисаним анти-мишјим F4/80, CD3 и NK1.1 антителима и визуелизације уз помоћ Mouse Specific HRP/DAPI Detection ИHC Kit-a (Abcam), ткивни препарати ће бити инкубирани са зечјим анти-мишјим NLRP3, IL-1β, AGE, RAGE, IL-4, IL-13 и Gal-3 антителима уз визуелизацију помоћу Expose Rb specific HRP/AEC detection ИHC Kit-a (Abcam), према препорукама произвођача.

### **Имунофлуоресценца панкреасних острваца, висцералног адипозног ткива и јетре:**

Након пермеабилizације крио и депарафинизованих исечака одговарајућих ткива употребом леденог ацетона у трајању од 5 минута, могуће неспецифично везивање антитела биће блокирано уз помоћ 10% normal goat serum-a у PBS-у. Примарна поликлонска анти-мишја NLRP3, AGE, RAGE и IL-1β антитела (Abcam, Cambridge, MA, USA) биће инкубирана 1h на RT. Након испирања препарата у PBS-у, одговарајуће секундарно анти-IgG антитело PE-Cy 5.5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ће бити инкубирано 45 минута. Инсулин и про-инсулин, лимфоцитна и макрофагна инфилтрација биће визуелизоване применом одговарајућих флуорохром-коњугованих моноклонских антитела (Abcam, Cambridge, MA, USA). Након испирања, обојени пресеци ће бити прекривени mounting medium-ом који садржи DAPI за визуелизацију нуклеуса (ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Анализа имунофлуоресценце ће бити урађена уз помоћ инвертног микроскопа Nikon eclipse Ti-E са припадајућим софтвером (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

### **Одређивање концентрације протеина у ткивима Western blot методом:**

Лизати ткива панкреаса биће припремљени у раствору: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol (DTT), 0.01% w/v bromophenol blue, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml aprotinin, 2 mM EDTA, док ће протеини из висцералног адипозног ткива бити изоловани уз помоћ TRIzol реагенса (Genosys, Woodlands, TX, USA). Даља обрада узорака биће урађена према претходно описаном протоколу коришћењем примарних зечјих анти-мишјих ASC (1:500), NLRP3 (1:500), IL-1β (1:2500), Caspase-1 (1:500), NFκB (phospho S536) (1:500), NFκB p65 (1:500) антитела (Abcam) са секундарним HRP коњугованим анти-зечјим антителом (1:2500) (GE Healthcare, Buckinghamshire, England).



### **Ћелијска култура и *in vitro* стимулација:**

За верификацију активације NLRP3 инфламазома и каспаза-1 зависне продукције IL-1 $\beta$ , макрофаги добијени из перитонеалног испирка хладним PBS-ом ( $2 \times 10^5$ /well) биће куливисани у комплетном медијуму (DMEM) са 10% FBS-а на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору. Након претретирања LPS-ом у концентрацији 100 ng/ml 4h, ћелије ће бити стимулисане са BSA; палмитат-BSA (100 $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) или глукозом (22mM) (Sigma-Aldrich), у присуству или одсуству 10 $\mu$ M каспаза-1 инхибитора (Z-YVAD-FMK, Bachem AG, Bubendorf, Switzerland), у трајању од 24h. Након инкубације у супернатантима ће бити одређивани IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-12, ELISA методом. За испитивање експресије фосфорилисаног NF $\kappa$ B p65, макрофаги ће бити стимулирани LPS-ом (1 $\mu$ g/ml) и/или палмитатом (100 $\mu$ M), 2h. Након инкубације експресија фосфорилисаног NF $\kappa$ B p65 и NLRP3 инфламазома у култивисаним ћелијама ће бити анализирани методом проточне цитометрије.

### **Искључивање гена за NLRP3 инфламазом методом трансфекције siRNA (енгл. *small interfering RNA*):**

Ћелије добијене перитонеалним испирањем ( $1 \times 10^6$ /well) ће бити трансфектоване у медијуму (DMEM) са 5% FBS-а без додатих антибиотика, употребом мишје Cryopyrin siRNA за искључивање гена за NLRP3 инфламазом и контролне siRNA (Control siRNA, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) у трансфекционом медијуму (siRNA Transfection Medium, Santa Cruz Biotechnology), 7h. FITC коњугована контролна siRNA ће бити коришћена као позитивна контрола. Након трансфекције, ћелије ће бити култивисане у комплетном медијуму (DMEM) и претретиране LPS-ом у концентрацији 100 ng/ml 4h. После претретирања, ћелије ће бити стимулисане палмитатом у концентрацији 100 $\mu$ M, 18h на 37°C у присуству 5% CO<sub>2</sub>. Након инкубације, у супернатантима ће бити измерена концентрација продукваног IL-1 $\beta$  ELISA методом.

### **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 Т 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 20 за сваку од група. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни Т тест или Mann-Whitney тест) 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 Т тест за обележја са нормалном расподелом, као и Kruskal-Wallis и Mann-Whitney тестови за

непараметарска обележја. За тестирање зависности између појединих варијабли 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

Улога Gal-3 у ефикасном уклањању крајњих продуката метаболизма глукозе и липида представља снажан протективни механизам у настанку инфламације у циљним ткивима као што је висцерално адипозно ткиво и острвца ендокриног панкреаса, која је у основи патогенезе гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a. У одсуству Gal-3 на дијети са високим садржајем масти расте ниво крајњих продуката метаболизма липида и глукозе (ALE, AGE), који вероватно различитим сигналним путевима покрећу инфламацију и убрзавају развој гојазности, уз значајно увећање количине висцералног адипозног ткива и инсулинске резистенције, а каснијем стадијуму и појаве хипергликемије. У основи метаболичких дисфункција је системска инфламација која се огледа у повишеним концентрацијама CRP-а и про-инфламаторних цитокина (IL-1 $\beta$ , IL-6 и IFN- $\gamma$ ) у серуму, као и сниженим концентрацијама анти-инфламаторних IL-10 и IL-13. Централно место настанка инфламације је висцерално адипозно ткиво где долази до ране инфилтрације тип 1 T и NKT лимфоцита, праћене значајним смањењем заступљености регулаторних T лимфоцита. Као последица настаје поларизација макрофага у смеру про-инфламаторног M1 фенотипа, уз значајно смањену заступљеност алтернативно активираних M2 макрофага.  $\alpha$ GalCer-ом активирани NKT ћелије, у зависности од услова средине и ћелијског фенотипа, продукцијом про-инфламаторних (IFN- $\gamma$ ) или анти-инфламаторних (IL-4, IL-13) цитокина, стимулишу или супримирају стечени имунски одговор и вероватно утичу на поларизацију макрофага ка про-инфламаторном M1, односно анти-инфламаторном M2 фенотипу. Очекиваном поларизацијом имунског одговора, активирани NKT ћелије посредују у контроли инфламације и гликорегулације у гојазних мишева.

У Gal-3 дефицијентних мишева на исхрани богатој мастима, долази до ране инфилтрације острваца ендокриног панкреаса ћелијама моноцитно/макрофагно лозе и појаве инсулитиса, што резултира појавом хипергликемије у раној фази индукције болести. Највероватнији механизам настанка инфламације је активација NLRP3 инфлазома од стране засићених масних киселина (палмитат) и следствена каспаза-1 посредована секреција IL-1 $\beta$  у инфилтришућим макрофагима у висцералном адипозном ткиву и панкреасним острвцима. Такође, липополисахаридом и палмитатом стимулирани макрофаги Gal-3 дефицијентних мишева повећано експримирају фосфорилирани NF $\kappa$ B p65 транскрипциони фактор укључен у регулацију про-инфламаторних гена, што представља додатни механизам настанка инфламације у испитиваном моделу болести. Претпоставка је да би дефинисање и разумевање протективног ефекта Gal-3 у патогенези метаболичких поремећаја, нарочито у раним фазама развоја гојазности и инсулинске резистенције, могли имати значајну терапијску примену.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи комплементарне експерименталне приступе у мишева генетски дефицијентних у експресији галектина-3 и одговарајућих контрола, биће испитана улога галектина-3 у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a након индукције болести применом дијете са високим садржајем масти. Планираним истраживањем треба испитати улогу Gal-3 у

инфламацији повезаној са настанком гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a, као и дефинисати могући механизам настанка инфламације.

## **2.10. Научна област дисертације**

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална интерна медицина

## **2.11. Научна област чланова Комисије**

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Нада Пејновић, редовни професор за ужу научну област Патолошка физиологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, члан

## **Закључак и предлог Комисије**

Др Јелена Пантић је сарадник у настави на предмету Микробиологија и имунологија Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, и на основу своје досадашње стручне, научне и педагошке активности испуњава услове да приступи изради докторске дисертације која је представљена. Кандидат је овладао целуларним и молекуларним техникама савремених медицинских истраживања које су неопходне за свеобухватну израду ове комплексне теме о улози галектина-3 у настанку гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a.

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова кандидат др мед. Јелена Пантић, испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.

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

Комисија предлаже Већу ментора Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Јелене Пантић, под називом "**Галектин-3 у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a**" и одобри њену израду.

## **Предлог ментора**

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Миодрага Лукића, професор емеритуса Универзитета у Крагујевцу. Проф. др Миодраг Лукић 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, 16.01.2013. године

## **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

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

---

**Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

---

**Станислава Стошић-Грујичић**, научни саветник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" у Београду, члан

---