

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-03-279/29 од 14.04.2021. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Милице Величковић под називом:

„Улога галектина-3 у мишјим моделима експерименталних инфламацијских пародонталних болести“

Чланови комисије су:

1. **проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **проф. др Радмила Обрадовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Орална медицина и пародонтопатија, члан
3. **проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Милица Величковић, рођена је 23.02.1994. године у Смедеревској Паланци, Република Србија. Завршила је „Паланачку гимназију“ математичког смера у Смедеревској Паланци као носилац „Вукове дипломе“, 2013. године. Школске 2013/2014. године уписала је Интегрисане академске студије стоматологије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, а јула 2018. године дипломирала је у року, са просечном оценом 9,51. Током прве, друге, треће и четврте године студирања била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Р. Србије, а као студент завршне године основних академских студија стипендиста Фонда за младе таленте („Доситеја“).

Уписала је докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу септембра 2018. године. Завршила је пети семестар, треће године докторских академских студија са положеним усменим докторским испитом, на смеру Имунологија, инфекција и инфламација са просечном оценом 10 (десет).

Од марта 2019. године ангажована је као истраживач приправник, на пројекту ОИ175069 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Р. Србије, јуниор пројекту (ЈП 20-19) „Галектин-3 у патогенези експерименталних периапексних периодонтитиса“ и међународном пројекту под називом „Биолошки ефекти естраката и молекула изолованих из биљака са територије Балкана“. Похађа специјалистичку наставу из гране медицине Превентивна и дечја стоматологија коју је уписала децембра 2019. године.

На студијском програму Интегрисаних академских студија стоматологије Факултета медицинских наука у Крагујевцу, за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија била је ангажована као фацилитатор за зимски и летњи семестар школске 2018/2019. године и летњи семестар школске 2019/2020. године, као и на предметима Ортопедија вилица и Дентална оклузија у зимском семестру школске 2019/2020. године. Од августа 2020. године запослена је као сарадник у настави за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Улога галектина-3 у мишијим моделима експерименталних инфламацијских пародонталних болести“

Предмет: Испитивање улоге галектина-3 у патогенези експерименталних пародонталних болести и то коришћењем C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева и два експериментална модела болести: 1. експерименталне пародонтопатије и 2. експерименталног перирадикуларног пародонтитиса.

Хипотезе: Одсуство галектина-3 спречава или ублажава развој експерименталних пародонталних болести.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат Милица Величковић је објавила рад у целини у часопису категорије **M21** у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Velickovic M, Arsenijevic A, Acovic A, Arsenijevic D, Milovanovic J, Dimitrijevic J, Todorovic Z, Milovanovic M, Kanjevac T, Arsenijevic N. Galectin-3, Possible Role in Pathogenesis of Periodontal Diseases and Potential Therapeutic Target. Front Pharmacol. 2021; 12:638258. M21 IF= 4.225 (2019)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Болести пародонцијума укључују низ инфламацијских процеса који утичу на потпорне структуре зуба, гингиву, кост, цемент и периодонтални лигамент и према класификацији из 2017. године деле се на: 1) болести и стања која захватају десни и пародонтално здравље; 2) пародонтопатије; и 3) друга стања која захватају пародонцијум. Болести пародонцијума настају када се поремети равнотежа између микроорганизама и домаћина, услед дисбаланса у микробиому зубног плака или услед промене инфламацијске/имунске реакције домаћина на микроорганизме. Резултат поремећене хомеостазе је запаљење које узрокује оштећење пародонталног ткива, укључујући ресорпцију алвеоларне кости

остеокластима, разградњу периодонталног лигамената матриксним металопротеиназама и стварање гранулативног ткива. Пародонтопатија је запаљенско обољење пародонцијума праћено активацијом сопствених протеиназа које учествују у деструкцији потпорног апарата зуба. Ендо-пародонталне лезије су болести пародонта које се сврставају у друга стања која захватају пародонцијум а које карактерише захватање и пулпе и пародонцијума патолошким процесом и могу да буду последица: 1) запаљења пулпе које захвата и пародонцијум што за резултат има развој хроничног перирадикуларног пародонтитиса; 2) оштећења или запаљења пародонцијума које се проширило на канал корена зуба; или 3) оба процеса која се дешавају у исто време.

У ранијим студијама показано је да пародонтопатију може покренути један микроорганизам, *Bacteroides gingivalis*. Касније је показано да је тежина пародонтопатије повезана са присуством анаеробних Gram-негативних бактерија у усној дупљи, док су Gram-позитивне бактерије, са доминацијом врста из рода *Streptococcus*, присутне у пародонцијуму здравих зуба. Сада је добро позната и прихваћена чињеница да је дисбиоза оралног микробиома кључна у развоју болести и да пародонтопатија настаје и напредује услед активности целокупне субгингивалне микробне заједнице на оболелим местима, које карактеришу већа заступљеност патогених а смањени удео коменсалних микроорганизама, а не као последица једног патогена, и његове интеракције са имунским системом домаћина. Интензитет инфламацијског одговора домаћина на микробни плак је индивидуална карактеристика на коју утичу генски фактори домаћина, одређене генске варијанте гена за IL-1RN повезане са клиничким манифестацијама гингивитиса као одговор на *de novo* формирање плака.

Галектин-3 (Gal-3) је еволуцијски конзервирани лектин који производе различити типови ћелија, укључујући имунске и епителне ћелије и фибробласти. Gal-3 утиче на функцију имунских ћелија а у зависности од различитих фактора, његове унутарћелијске или екстраћелијске локализације али и типа ћелије на коју делује, може имати двојно дејство, про- или анти-инфламацијско. Такође, Gal-3 је кључна компонента у одбрани домаћина од микроорганизама, директно стимулише инфламацијски одговор на микроорганизме играјући улогу рецептора који препознају молекулске обрасце микроорганизама (енг. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP), а такође игра улогу обрасца за препознавање оштећених ћелија (енг. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP). Gal-3

који се ослобађа из ћелије инфициране микроорганизмима директно стимулише миграцију и производњу медијатора запаљења у ћелијама урођене имуности.

2.5. Значај и циљ студије

Значај студије

Значај Gal-3 у развоју болести пародонцијума до сада није истраживан у експерименталним моделима болести, а овим испитивањем би утврдили улогу Gal-3 у патогенези ендодонталне лезије (перирадикуларног пародонтитиса) и пародонтопатије и утицај на доминантни патохистолошки тип промене. Овим истраживањем би евентуално указали на нове терапијске приступе у лечењу болести пародонцијума.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је да се утврди улога галектина-3 у патогенези експерименталних пародонталних болести и то коришћењем C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева и два експериментална модела болести: 1. експерименталне пародонтопатије и 2. експерименталног перирадикуларног пародонтитиса.

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

1. Испитивањем хистолошких параметара инфламације и деструкције алвеоларне кости утврдити значај галектина-3 у патогенези експерименталних пародонталних болести.
2. Анализом инфилтрата присутним у ткиву пародонцијума Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести и мононуклеарних ћелија изолованим из субмандибуларних лимфних чворова испитати утицај галектина-3: на састав инфилтрата, фенотипске и функционалне карактеристике Т лимфоцита, макрофага, дендритских ћелија и неутрофила у пародонцијуму и фенотип ћелија у субмандибуларном лимфном чвору.
3. Испитати утицај галектина-3 на цитокински профил у пародонталном ткиву мишева у различитим временским интервалима након индукције болести.
4. Утврдити утицај галектина-3 на активацију и развој инфламацијског фенотипа макрофага у пародонцијуму.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Иако је познато да Gal-3 утиче на кључне процесе који играју главну улогу у патогенези болести пародонцијума, инфламацијске/имунске реакције и антимикробну активност, нема података о његовој могућој улози у развоју ових болести, осим неколико извештаја о експресији Gal-3 у различитим формама запаљенских промена у периапексном пародонцијуму код људи и податка да је одсуство галектина-3 удружено са смањеним интензитетом инфламације у периапексном ткиву миша четири и шест недеља од отварања зубне пулпе.

Планираним истраживањем експерименталних болести пародонцијума изазваних утискивањем хируршког конца између првог и другог молара максиле (модел експерименталне пародонтопатије) или отварањем пулпе првих молара (модел перирадикуларног пародонтитиса-ендо-пародонталне лезије), код Gal-3^{-/-} и *wild type* мишева испитала би се улога Gal-3 у развоју и прогресији болести пародонцијума.

2.7. Материјал и метод

2.7.1. Врста студије

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

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживање ће се обавити на мишевима мушког пола старости 8-12 недеља соја C57BL/6 (енгл. *Wild Type*, WT) и Gal-3 дефицијентним мишевима (Gal-3^{-/-}) на C57BL/6 подлози. Gal-3 дефицијентни мишеви потичу са Универзитета Калифорнија Давис и нама су уступљени љубазношћу D.K. Hsu-а и F.T. Liu-а. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број 01-8686/9).

2.7.3. Узорковање

Мишеви ће бити подељени у следеће групе:

1. C57BL/6 *wild type* мишеви којима ће се индуковати ендо-пародонтална лезија, форма перирадикуларног пародонтитиса
2. C57BL/6 Gal-3 *knock-out* мишеви којима ће се индуковати ендо-пародонтална лезија, форма перирадикуларног пародонтитиса
3. C57BL/6 *wild type* мишеви којима ће се индуковати пародонтопатија
4. C57BL/6 Gal-3 *knock-out* мишеви којима ће се индуковати пародонтопатија
5. C57BL/6 *wild type* нетретирани мишеви
6. C57BL/6 Gal-3 *knock-out* нетретирани мишеви

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независна варијабла: присуство/одсуство галектина-3

Зависне варијабле: величина инфламацијске лезије, величина остеолитичке лезије, концентрације цитокина, проценти активираних и инфламацијских макрофага, проценти Т лимфоцита који експримирају IL-17, проценти Т лимфоцита који експримирају IFN- γ , проценти неутрофила и ниво експресије галектина-3, NLRP3, ASC, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17, TNF- α , TLR4 у пародонталном ткиву.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Студијски узорак је израчунат узимајући α као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student*-ов t тест (два независна узорка), упоређујући групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима (процент CD8⁺ ћелија у периапексном ткиву) између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 20 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's* t тестом за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе животиња, са снагом студије $\geq 80\%$.

2.7.6. Статистичка обрада података

Добијени резултати ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне грешке. Статистичка значајност ће се одређивати *Student*-овим *t* тестом, а по потреби и *Mann-Whitney*-евим тестом и *ANOVA* тестом. Статистичка значајност ће бити претпостављена за $p=0.05$. Све статистичке анализе ће бити обављене уротребом програма SPSS 20.0.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да мишеви са делецијом гена за Gal-3 имају знатно блажу форму пародонталних болести и значајно мању инфилтрацију моноклеарних ћелијама у пародонталном ткиву. Ово очекивање засновано је претпоставци да Gal-3 игра значајну улогу у индукцији имунског одговора на микроорганизме оралне микрофлоре, тј. да у одсуству овог молекула нема адекватног развоја инфламацијског одговора на микроорганизме и последично нема адекватне активације Т лимфоцита.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Пародонталне болести су хроничне инфламацијске болести које настају услед дисбаланса између заједнице микроорганизма у усној дупљи и инфламацијског/имунског одговора домаћина који за резултат има деструкцију потпорног апарата зуба а тиме и губитак алвеоларне кости. Gal-3 је лектин који везује β -галактозид и има важну улогу у бројним биолошким процесима. Директним везивањем за микроорганизме и модулацијом њиховог клиренса, Gal-3 може утицати на састав микробне заједнице у усној дупљи. Gal-3 такође модулише функцију имунских ћелија у гингиви и гингивалном сулкусу и тако утиче на имунску хомеостазу. У неколико клиничких студија показана је повећана експресија Gal-3 у различитим болестима пародонцијума, али нема података о утицају Gal-3 на развој ових болести. Главни циљ истраживања је да се утврди улога Gal-3 у развоју пародонталних болести код миша.

Као експерименталне животиње користиће се Gal-3 дефицијентни мишеви соја C57BL/6 (енгл. Gal-3 *knockout mice*, Gal-3^{-/-}) и мишеви C57BL/6 *Wild Type*, WT, старости до 12 недеља. Ендо-пародонталне лезије ће се изазвати отварањем зубне пулпе првих молара

максиле и мандибуле, а пародонтопатија постављањем лигатуре између првог и другог молара максиле. Болест ће се дијагностиковати квантификавањем инфламације у пародонцијуму и коштаног губитка на препаратима бојеним хематоксилином и еозином. Испитаће се активација макрофага и фенотип лимфоцита у пародонталном ткиву и субмандибуларним лимфним чворовима WT и Gal-3^{-/-} мишева. Утврдиће се цитокински профил и експресија молекула који играју улогу у развоју пародонталних болести.

Очекује се да одсуство галектина-3 ублажава развој експерименталних пародонталних болести. Gal-3 стимулацијом активације макрофага доприноси развоју снажнијег запаљенског одговора на микроорганизме усне дупље и тако појачава активацију Т лимфоцита што за резултат има веће оштећење пародонталног ткива.

3. Предлог ментора

Због специфичности теме и методологије истраживања комисија предлаже коменторе ове докторске дисертације **проф. др Татјану Кањевац**, ванредног професора Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија и **проф. др Марију Миловановић**, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија.

Предложени наставници испуњавају услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови **проф. др Татјане Кањевац** који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Kanjevac T, Gustafson C, Ivanovska A, Ravanetti F, Cacchioli A, Bosnakovski D. Inflammatory Cytokines and Biodegradable Scaffolds in Dental Mesenchymal Stem Cells Priming. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2019; 14(4):320-326.
2. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, Jovanovic M, Zdravkovic N, Kanjevac T, Harrell CR, Fellabaum C, Dolicanin Z, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent

- expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Therap Adv Gastroenterol.* 2018;11:1-22.
3. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, Mitrovic S, Jeftic I, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2016;45(1):70-76.
 4. Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. ST2 Deletion Increases Inflammatory Bone Destruction in Experimentally Induced Periapical Lesions in Mice. *J Endod* 2015; 41(3):369-375.
 5. Tanaskovic-Stankovic S, Tanaskovic I, Jovicic N, Miletic-Kovacevic M, Kanjevac T, Milosavljevic Z. The mineral content of the hard dental tissue of mesiodens. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2018;162(2):149-153.
 6. Djordjevic G, Dagovic A, Ristic V, Kanjevac T, Brajkovic D, Popovic M. Trends and Patterns of Disparities in Oral Cavity and Pharyngeal Cancer in Serbia: Prevalence and Economic Consequences in a Transitional Country. *Front Pharmacol.* 2017;8:385.
 7. Velickovic M, Mitrovic S, Kanjevac T, Radosavljevic G, Pavlovic S, Lukic A. Gradation criteria for experimentally induced periapical lesions in mice. *Ser J Exp Clin Res* 2013; 14 (2): 71-76.

Радови проф. др Марије Миловановић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Djordjevic D, Stanojevic I, Jankovic N, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Milovanovic M. Gal-3 Deficiency Suppresses *Novosphynobium aromaticivorans* Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. *Front Immunol.* 2019;10:1309.
2. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML, Milovanovic M. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection. *Front Microbiol.* 2019;10:185.
3. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2017;8:192.

4. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep.* 2016;6:23348.
5. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2012 J;55(6):1954-64.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Имунологија, инфекција и инфламација

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **проф. др Радмила Обрадовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Орална медицина и пародонтопатија, члан
3. **проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикацију др Милице Величковић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да утврди улогу галектина-3 у патогенези експерименталних пародонталних болести и то коришћењем C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева и два експериментална модела болести: 1. експерименталне пародонтопатије и 2. експерименталног перирадикуларног пародонтитиса.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Милице Величковић под називом „Улога галектина-3 у мишјим моделима експерименталних инфламацијских пародонталних болести“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

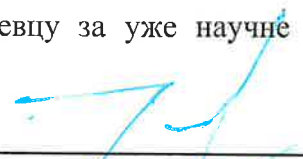
Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник



Проф. др Радмила Обрадовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Орална медицина и пародонтопатија, члан



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



У Крагујевцу, _____ 2021. године