

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Наставно-научног већа

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 24.02.2016. године, одлуком 01-1414/2-17 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др мед. Бојане Симовић Марковић под називом: „Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса“, у следећем саставу:

1. **Проф. др Миодраг Л. Лукић**, професор емеритус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
3. **Проф. др Владимир Трајковић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Бојане Симовић Марковић и подноси Наставно-научном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата др Бојане Симовић Марковић под називом „Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса“, урађена под менторством доц. др Владислава Воларевића, доцента Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, представља оригиналну студију која се бавила испитивањем улоге и значаја галектина-3 у експерименталном моделу акутног колитиса.

Улцерозни колитис уз Кронову болест је главни клинички ентитет инфламацијске болести црева (енгл. *Inflammatory Bowel Disease- IBD*). Инфламацијска болест црева представља хронични интестинални поремећај у чијој патогенези учествује неколико фактора. Иако је механизам настанка ове болести још увек неразјашњен, познато је да дисрегулација имунског система, коменсалне бактерије, оксидативни стрес и медијатори запаљења учествују у патогенези инфламацијске болести црева.

У циљу разумевања различитих етиолошких фактора ове болести описано је неколико модела експерименталног колитиса, међу којима је најчешће коришћени колитис изазван декстран натријум сулфатом (енгл. *Dextran Sodium Sulphate-DSS*). Клиничке и хистопатолошке карактеристике колитиса изазваног DSS-ом су сличне као у пацијената са инфламацијском болести црева. Клиничке манифестације у акутној фази колитиса су губитак телесне масе, дијареја, окултно крварење у столицама, пилоерекција, анемија и на крају смрт. Типичне хистолошке промене су деплација муцина, дегенерација епитела и некроза која прогредира у нестанак епителних ћелија. Губитак епитела је праћен улцерацијама и инфилтрацијом леукоцита. Инфилтрацијом ламине проприје и субмукозе неутрофилима, јавља се криптитис и сам абцес крипти. У патогенези акутног модела колитиса кључну улогу имају макрофаги. Макрофаги из мукозе колона фагоцитишу абсорбован DSS, активирају инфламазом, чије компоненте (NLRP3 и ASC-1) активирају каспазу-1, која ослобађа активне форме IL-1 β и IL-18. Уз макрофаге, NKT ћелије, дендритске ћелије, неутрофили и мастоцити имају такође важну улогу у патогенези ове

болести. NKT ћелије имају протективну улогу у акутном колитису, док дендритске ћелије продукцијом проинфламаторних цитокина (IL-6 и TNF- α) и хемокина регрутују неутрофиле, који продукцијом IL-1 β додатно појачавају инфламацију у акутном колитису. Сматра се да у патогенези акутног колитиса изазваног DSS-ом не учествују В и Т лимфоцити.

Галектин-3 (Gal-3) припада групи убиквитарних лектина и најпре је идентификован као површински антиген кога испољавају перитонеални макрофаги мишева под утицајем тиогликолата и зато се означава као Mac-2. Овај лектин се експримира на епителним и ендотелним ћелијама, као и на ћелијама имунског система (макрофагима, дендритским ћелијама, NK ћелијама, NKT ћелијама), које учествују у патогенези акутног колитиса. Литературни подаци указују на улогу Gal-3 у патогенези тумора и аутоимунских болести. Серумска концентрација Gal-3 је повећана код пацијената са активном формом улцерозног колитиса. Показано је да се повећава експресија Gal-3 у цревној ламини проприји и криптама епитела током прогресије болести. Експресија Gal-3 је варијабилна у зависности од врсте мишева и модела колитиса. Међутим, улога и значај Gal-3 за активацију, миграцију, фенотип и функцију ћелија имунског система одговорних за настанак и прогресију акутног колитиса нису још увек разјашњени.

Ова студија показује да делеција Gal-3 гена и превентивна примена инхибитора за Gal-3 смањује клиничке симптоме и редукује оштећење ткива колона у мишићем моделу акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом. Делеција гена за Gal-3 значајно смањује активацију NLRP3 инфламазома и продукцију IL-1 β у макрофагима у почетној фази колитиса. Макрофаги Gal-3 дефицијентних мишева продукују мање инфламаторних цитокина што узрокује мањи број инфламаторних дендритских ћелија и неутрофила у колон, односно манифестује се значајно блажим колитисом.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Претрагом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података "Medline" и "CoBSON" помоћу следећих кључних речи: галектин-3, DSS колитис, улцерозни колитис, NLRP3 инфламазом, макрофаги и интерлеукин-1 β (Galectin-3, DSS colitis, ulcerative colitis, NLRP3 inflammasome, macrophages и IL-1 β) нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Бојане Симовић Марковић под називом „Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса“, представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

A. Лични подаци

Кандидат др мед Бојана Симовић Марковић рођен је 26.01.1984. у Краљеву. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је 2003. године, а дипломирала је 2009.

Др Бојана Симовић Марковић се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Током 2013. године (април-мај) усавршавала се у лабораторији професора *Ranieri Cancetta*, Ђенова, Италија. Такође, током 2009. године је провела неколико месеци у лабораторији професора Konstantin Kappas-а, Лариса, Грчка. Учесник је међународног *European Chron's and Colitis Organisation*- ЕССО пројекта као и јуниор пројеката Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Аутор је и коаутор 12 радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом. Збирни импакт фактор радова је 39,74 у М20 категорији и то М21= 32,573; М22= 2,011 и М23=5,156.

Од 20010/2011. године др Бојана Симовић Марковић је студент Докторских академских студија-изборно подручје Молекулска медицина– подподручје: Имунологија, инфламација и инфекција, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Усмени докторски испит је положила у октобру 2012. године са оценом 10 (десет). Рецензент је часописа *Stem Cells International*.

Тема докторске дисертације под називом „Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса“, представља резултат оригиналног научног рада, прихваћена је 2014. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Кандидат др Бојана Симовић Марковић, остварила је 58 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

1. **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Mitrovic S, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 β in macrophages. *J Crohns Colitis* 2016; doi:10.1093/ecco-jcc/jjw013 **M21- 8 бодова**
2. **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic ML, Volarevic V. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 2640746 **M23- 3 бода**
3. Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, **Simovic Markovic B**, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D, Lukic ML, Trajkovic V. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage. *ACS Nano* 2014; 8:12098-109. **M21- 8 бодова**
4. Volarevic V, **Markovic BS**, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of

dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45:531-43.

M21- 8 бодова

5. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, **Simovic Markovic B**, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol* 2015; 89:437-50. **M21- 8 бодова**
6. Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Simovic-Markovic BJ**, Stojanovic SP, Stefanovic SM, Pejnovic NN, Arsenijevic NN. Clinical significance of Cyclin D1, FGF3 and p21 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J BUON* 2014; 19:944-52. **M23- 3 бода**
7. Potočňák I, Vranec P, Farkasová V, Sabolová D, Vataščinová M, Kudláčová J, Radojević ID, Čomić LR, **Markovic BS**, Volarevic V, Arsenijevic N, Trifunović SR. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part VI: Synthesis, structures, in vitro DNA binding, antimicrobial and anticancer properties of first row transition metal complexes with 5-chloro-quinolin-8-ol. *J Inorg Biochem* 2016; 154:67-77. **M21- 8 бодова**
8. Ratković Z, Muškinja J, Burmudžija A, Ranković B, Kosanić M, Bogdanović G, **Simović Marković B**, Nikolić A, Arsenijević N, Đorđević S, Vukićević R. Dehydrozingerone based 1-acetyl-5-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: synthesis, characterization and anticancer activity. *J Mol Struct* doi: 10.1016/j.molstruc.2015.12.079. **M23- 3 бода**
9. Mijajlovic M, Nikolic M, Jevtic V, Ratkovic Z, **Simovic Markovic B**, Volarevic V, Arsenijevic N, Novakovic S, Bogdanovic G, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the bis(S-butyl-thiosalicylate) palladium (II) complex, [Pd(S-bu-thiosal)2]. *Polyhedron* 2015; 90:34-40. **M22- 5 бодова**
10. **Simovic Markovic B**, Vucicevic L, Bojic S, Volarevic V. The role of autophagy in immunity and autoimmune diseases. *Ser J of Exp Clin Res* 2014; 15:223-229. **M52= 1,5 бод**

11. Volarevic A, **Simovic Markovic B**, Jankovic N, Bojic S, Zdravkovic N. Orthodox Catechism affects gender differences in adolescents' needs for affiliation and achievement altering their sense of purpose in life. Ser J of Exp Clin Res 2014; 15: 33-38. **M52= 1,5 бод**
12. Bojic S, **Simovic Markovic B**, Volarevic A, Stojkovic M. Intestinal stem cells. Med Čas 2013; 47:192-195. **M53= 1 бод**

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду су остали исти. Примењена методологија истраживања је идентична са одобреном. Докторска дисертација др Бојане Симовић Марковић написана је на 158 страна и садржи следећа поглавља: увод, циљеве истраживања, материјал и методе, резултате, дискусију, закључак и литературу.

У уводном делу кандидат је јасно, прецизно и свеобухватно, користећи најсавременије литературне податке, изложио досадашња сазнања о патогенези колитиса изазваног декстран натријум сулфатом, са посебним освртом на улогу различитих ћелија имунског система и цитокина у процесу настанка оштећења ткива колона. У даљем делу увода наглашене су структурне особине и биолошка функција Gal-3 молекула, као и његова улога у имунском одговору. Јасно су изложени циљеви и конкретни задаци, при чему је основни циљ да се испита улога галектина-3 у патогенези акутног колитиса изазваног применом декстран натријум сулфата у мишева којима недостаје галектин-3 и одговарајућих контрола.

Материјал и методологија рада су подударни са наведеним у пријави дисертације, презентовани су на одговарајући начин и врло прецизно. Детаљно су описане све технике коришћене у студији.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани. Делација Gal-3 гена и превентивна примена Gal-3INH смањује клиничке симптоме и редукује оштећење ткива колона у мишићем моделу акутног колитиса изазваног декстран

натријум сулфатом. Показано је да делеција гена за Gal-3 значајно смањује активацију NLRP3 инфлазама и продукцију IL-1 β у макрофагима у иницијалној фази колитиса. Макрофаги мишева дефицијентних за Gal-3 продукују мање инфламаторних цитокина што узрокује мањи број инфламаторних дендритских ћелија и неутрофила у ткиву колона, односно манифестује се значајно блажим колитисом. Додатно је документовано да превентивна примена *Davanat*-а ублажава клиничку слику акутног колитиса и оштећење колона, као и да смањује секрецију про-инфламаторних цитокина и експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона мишева.

У поглављу Дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су опширни, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. Резултати су дискутовани у контексту сличних, различитих, па чак и конфликтних података о улози галектина-3 у развоју акутног колитиса. При томе су наведени ставови из најзначајнијих оригиналних и ревијских научних радова поменуте области.

Литература је адекватна по обиму и садржају. Цитирано је 383 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Мишеви дефицијентни за Gal-3 третирани декстран натријум сулфатом спорије развијају клинички ток болести, што се манифестује мањим клиничким скором и мањим губитком телесне масе.
2. Gal-3 дефицијентни мишеви третирани декстран натријум сулфатом имају мању инфламацију у ткиву колона, што се огледа у значајно мањем скраћењу дужине колона и редукованом оштећењу ткива колона.
3. Делеција Gal-3 гена инхибира секрецију про-инфламаторних цитокина и смањује број инфламаторних ћелија у ламину проприју ткива колона.
4. Смањена инфилтрација про-инфламаторних M1 макрофага, инфламаторних дендритских ћелија, неутрофила и мастоцита, док је значајно повећана

заступљеност анти-инфламаторних M2 макрофага и регулаторних дендритских ћелија у ткиву оболелог колона у мишева дефицијентних за Gal-3.

5. У одсуству Gal-3 молекула је смањено депоновање NALP-а и IL-1 β у ткиву колона мишева третираних декстран натријум сулфатом.
6. Делетија гена за Gal-3 утиче на смањену активацију NLRP3 инфлазома и следствену каспаза-1 зависну продукцију IL-1 β у F4/80+ макрофагима у перитонеуму и ткиву мишева третираних декстран натријум сулфатом
7. Перитонеални макрофаги Gal3^{-/-} мишева показују мању експресију NLRP3 инфлазома и смањену продукцију IL-1 β на стимулацију LPS-ом и DSS-ом.
8. Превентивна применена *Davanat*-а ублажава клиничку слику акутног колитиса и оштећење колона
9. Превентивна примена *Davanat*-а смањује секрецију про-инфламаторних цитокина и експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона мишева

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати овог истраживања по први пут показују да галектин-3 игра важну улогу у патогенези акутног колитиса и смањењу оштећења ткива колона изазваног декстран натријум сулфатом. Механизам настанка инфламације у галектин-3 позитивних животиња третираних декстран натријум сулфатом, подразумева активацију NLRP3 инфлазома и следствену продукцију IL-1 β . Наиме, галектин-3 позитивни макрофаги након стимулације декстран натријум сулфатом и липополисахаридом имају повећану експресију NLRP3 и повећану продукцију IL-1 β *in vitro*. Додатно је показано да примена инхибитора галектина-3 (*Davanat*/GM-CT-01) смањује оштећење ткива колона, продукцију IL-1 β и експресију NLRP3. Убрзана и појачана инфламација у ткиву колона мишева позитивних на присуство галектина-3 указује на важну про-инфламаторну улогу Gal-3 у моделу акутног колитиса, што би могло да има терапијске импликације.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове докторске дисертације објављени су у два међународна часописа, категорије M21 и M23 са збирним импакт фактором 9,047.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Бојане Симовић Марковић под називом „Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса“, на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Бојане Симовић Марковић урађена под менторством доц. др Владислава Воларевића, представља оригинални научни рад и има велики научни и практични значај у разумевању улоге галектина-3 у развоју акутног колитиса.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, да докторска дисертација под називом „Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса“, кандидата др Бојане Симовић Марковић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

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

Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

У Крагујевцу, 25.02.2016. године.