

ОДЛУКА ВЕЋА ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ О  
ФОРМИРАЊУ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 19.02.2020. године, одлуком бр. IV-03-93/27 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом "Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома" кандидата др Александра Арсенијевића, у следећем саставу:

1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
3. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата др Александра Арсенијевића 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 Александра Арсенијевића под називом "Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома", урађена под менторством проф. др Марије Миловановић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, представља оригиналну научну студију која се бави улогом и значајем галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса и то у експерименталном моделу болести изазване инфекцијом мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

Примарни билијарни холангитис (од енг. *Primary biliary cholangitis*, PBC) је орган специфична хронична болест у чијој патогенези су за деструкцију малих интрахепатичних жучних путева одговорни имунски механизми. За разлику од многих других аутоимунских болести у PBC је познат имунодоминантни аутоантиген- PDC-E2 исказан у холангиоцитима интрахепатичних жучних каналића. Сматра се да централно место у патогенези болести припада  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т лимфоцитима специфичним за имунодоминантне компоненте аутоантигена PDC-E2 присутног у холангиоцитима интрахепатичних жучних каналића, међутим и компоненте урођене имуности играју различите и важне улоге у свим фазама болести.

Галектин-3 (Gal-3) је гликопротеин присутан како у ћелијама тако и на ћелијској мембрани и у екстраћелијским течностима. Овај мултифункционални молекул игра различите и често бидирекционе улоге у различитим физиолошким и патолошким процесима. На различите начине регулише круцијалне механизме модулације инфламацијских и имунских реакција као што су: стабилизација органела; трансдукција сигнала; контрола ћелијске смрти; адхеренција; препознавање микроорганизама; активација, диференцијација и миграција лимфоцита и многе друге. У зависности од механизма који доминира у патогенези болести, Gal-3 може да има супротне ефекте на

развој аутоимунског процеса. Показани су супротни ефекти галектина-3 и у различитим фазама једне исте болести. Gal-3 инхибира апоптозу, тако смањује ослобађање аутоантигена и атенуира системски еритемски лупус (од енг. *Systemic Lupus Erythematosus*, SLE), али исто тако може да повећа продукцију интерферона тип 1 и тако појача аутоимунску реакцију у SLE. Претходно истраживање улоге Gal-3 у патогенези PBC указује на протективну улогу овог молекула у холангитису изазваном имунизацијом C57BL/6 мишева 2-октиноичном киселином. Gal-3 експримиран у холангиоцитима штити ове ћелије од апоптозе, смањује ослобађање аутоантигена, тако смањује стимулацију ћелија које презентују антигене и атенуира PBC. Скорије истраживање указује на проинфламацијску улогу Gal-3 код dnTGF- $\beta$ RII мишева (енг. *dominant negative form of Transforming Growth Factor Beta Receptor type II*, dnTGF- $\beta$ RII mice) који спонтано развијају аутоимунски холангитис. Имајући у виду супротне ефекте Gal-3 на ток примарног билијарног холангитиса у два различита модела болести од интереса је да се испита улога овог молекула и у моделу болести који се код мишева изазива инфекцијом убиквитарном, аеробном, G- бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. *Novosphingobium aromaticivorans* је коменсална бактерија слузнице дигестивног тракта људи. Познато је да коменсалне бактерије црева доприносе развоју спонтане инфламације жучних путева па је имунопатогенеза аутоимунског холангитиса који развију мишеви после инфекције овом бактеријом најсличнија патогенетским механизмима PBC код људи. Иако је G- бактерија *N. aromaticivorans* у ћелијском зиду не садржи липополисахариде већ гликофинголипиде који у комплексу са CD1d молекулима дендритских ћелија активирају NKT ћелије. Централну улогу у моделу PBC изазваном имунизацијом ксенобиотиком имају цитокини које продукују активирани мијелоидне ћелије док у моделу изазваном инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* кључну улогу у индукцији аутоимунског процеса играју NKT ћелије.

Резултати овог истраживања указују на значај галектина-3 у стимулацији инфламације у PBC изазваном инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, а који се огледа у активацији дендритских ћелија и инфлазома NLRP3 и последичној продукцији IL-1 $\beta$ . Адекватно активирани дендритске ћелије омогућавају активацију NKT ћелија неопходних за развој холангитиса изазваног инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* и активацију лимфоцита специфичних за PDC-E2.

Смањење инфламације билијарних каналића и фиброзе јетре у групи мишева третираних инхибитором галектина-3 указују да би галектин-3 могао да буде мета деловања потенцијалних нових лекова. Галектин-3 је вероватно укључен у инфламацијски одговор на коменсалне бактерије црева што може да буде инцијални окидач за развој примарног билијарног холангитиса.

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

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „Medline” и „KoBSON”, уз коришћење одговарајућих кључних речи: „ *Primary biliary cholangitis*”, „ *Novosphingobium aromaticivorans*”, „*galectin 3*”, „*C57BL/6 mice*”, „*inflammasome*”, „*dendritic cells*”, „*Gal-3 inhibitor*”, „*NKT cells*”, нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Александра Арсенијевића под називом "**Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома**" представља резултат оригиналног научног рада.

## **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

### **А. Лични подаци**

Др Александар Арсенијевић је рођен 30.11.1986. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву Крагујевачку гимназију завршио у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу уписао 2005/2006. и успешно завршио 2012. године са просечном оценом 9,65.

Активно учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. У мају 2013. године учествовао је у мултидисциплинарној школи „5<sup>th</sup> Course on Cytoskeleton: Cytoskeleton in Cell Organization“ на Институту Кири у Паризу.

Тема докторске дисертације под називом "**Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома**", прихваћена је 2019. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Кандидат др Александар Арсенијевић је до сада публиковао 1 рад у часопису категорије M21a, 15 радова категорије M21, 6 радова M22, 5 радова категорије M23 и 1 рад категорије M52. Резултати рада наведеног под редним бројем 1 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану докторске дисертације.

#### **Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану 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 *Novosphingobium aromaticivorans* Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. *Front Immunol.* 2019;10:1309. **M21; IF= 5,789 (2018)**
2. **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. **M21; IF=5,228 (2015)**
3. **Arsenijevic A**, Harrell CR, Fellabaum C, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Agents for the Treatment of Primary Biliary Cholangitis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2017;2017:7492836. **M23; IF= 1,574 (2017)**
4. **Arsenijevic A**, Milovanovic J, Stojanovic B, Milovanovic M, Gershwin EM, Leung P, Arsenijevic N, Lukic ML. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15(3):145-150. **M52**

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

Сprovedено истраживање усклађено је са пријављеном темом докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија идентични су са одобреним у пријави тезе. Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Докторска дисертација кандидата др Александра Арсенијевића садржи следећа поглавља: увод, циљ студије, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци и референце. Написана је на 107 страна и садржи 13 слика, 18 графикона и 1 табелу. Поглавље референце садржи 289 цитираних библиографских јединица из научних публикација. У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је на свеобухватан, јасан и прецизан начин, цитирајући релевантну литературу изложио актуелна сазнања о могућим

етиолошким факторима и патогенези примарног билијарног холангитиса, структури и функцији галектина 3 и познатим инхибиторима галектина-3.

Циљеви и хипотезе истраживања јасно су изложени и дефинисани у складу са одобреним у пријави тезе. Главни циљ истраживања је утврђивање улоге галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом мишева C57BL/6 бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

Материјал и методологија рада су детаљно и прецизно формулисани и истоветни су са наведеним и одобреним у пријављеној дисертацији. Све технике коришћене у студији су детаљно описане.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани. Слабије изражена болест са значајно мањим оштећењем билијарних каналића и мањом фиброзом јетре детектована је у групама *Lgals3*<sup>-/-</sup> и мишева третираних у фази индукције болести инхибитором галектина-3, GM-CT-01. У јетрама *wild type* мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* детектована је већа заступљеност инфламацијских макрофага, НК, НКТ и Т ћелија у инфилтратима. Делација *Lgals3* и третман инхибитором галектина-3, GM-CT-01, смањује оштећење јетре, фиброзу, мононуклеарни инфилтрат, експресију инфлазома NLRP3 у инфилтратима у јетри и продукцију IL-1 $\beta$  у јетри мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. *In vitro* стимулација *wild type* перитонеалних макрофага бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* за последицу има већу експресију NLRP3, активности каспазе-1 и продукције IL-1 $\beta$  у поређењу са стимулираним перитонеалним макрофагима *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева. GM-CT-01 такође редукује активацију дендритских ћелија и експресију цитокина IL-4, IL-1 $\beta$  и p40, заједничке субјединице IL-12 и IL-23 у дендритским ћелијама *in vitro* стимулираним бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

У поглављу „Дискусија” детаљно су анализирани и објашњени резултати истраживања и упоређивани са литературним подацима из исте области. Добијени резултати су дискутовани у контексту сличних, различитих и конфликтних података о утицају галектина-3 на активацију инфлазома, дендритских и НКТ ћелија и развоја примарног билијарног холангитиса. Коментари резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их веома прегледним и разумљивим.

Коришћена литература је адекватна по обиму, садржају и релевантности. Цитирано је 289 библиографских јединица из научних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата др Александра Арсенијевића под називом "**Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома**" по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## **2.5. Научни резултати докторске дисертације**

На основу резултата истраживања може се закључити да галектин-3 подстиче инфламацијски одговор на бактерију *Novosphingobium aromaticivorans* што последично омогућава развој аутоимунског одговора усмереног на аутоантиген присутан у епителним ћелијама малих билијарних каналића. Смањена инфилтрација билијарних каналића и смањена фиброза јетре у одсуству галектина-3 је резултат изостанка активације инфламазома у ћелијама мијелоидне лозе и последичне активације каспазе-1 и продукције IL-1 $\beta$ , као и изостанка активације дендритских ћелија што за последицу има и неадекватну активацију NKT ћелија неопходних за развој примарног билијарног холангитиса изазваног овом бактеријом. У одсуству галектина-3 је значајно смањен тип 17 имунског одговора и заступљеност цитотоксичких NK и NKT ћелија у јетри инфицираних мишева. Примена инхибитора галектина-3 у фази индукције болести значајно смањује инфламацију билијарних каналића, фиброзу јетре и инфлукс T1, T2 и T17 лимфоцита у јетру, а терапијска примена инхибитора смањује фиброзу јетре.

## **2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси**

Резултати овог истраживања дају оригиналан и важан допринос разумевању улоге галектина 3 у патогенези примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, моделу болести који у основи има имунопатогенетске механизме најсличније патогенетским механизмима примарног билијарног холангитиса код људи. Добијени резултати указују на прозапаљенску улогу галектина-3 у развоју примарног билијарног холангитиса и показују да примена инхибитора галектина 3 значајно смањује оштећење билијарних каналића и фиброзу јетре

у групи мишева инфицираних бактеријом, што указује на потребу даљег испитивања нових специфичнијих инхибитора галектина-3 као потенцијалних нових лекова за лечење примарног билијарног холангитиса.

## 2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове докторске дисертације објављени су у међународном часопису категорије M21 (Arsenijevic et al. *Front Immunol* 2019;10:1309). Резултати су такође представљени у форми презентација и оралног излагања на више значајних међународних конференција из области имунологије.

Планирано је и да остали резултати овог истраживања буду публиковани у неком од истакнутих часописа од међународног значаја.

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Александра Арсенијевића под називом **"Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома"** сматра да је истраживање у оквиру тезе базирано на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Александра Арсенијевића, под менторством проф. др Марије Миловановић, представља оригинални научни допринос у потпунијем сагледавању утицаја галектина 3 у патогенези и развоју примарног билијарног холангитиса изазваног код мишева инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* и указује на значај даљег истраживања потенцијалног терапијског дејства специфичнијих инхибитора галектина-3 у примарном билијарном холангитису.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом **"Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома"**, кандидата др Александра Арсенијевића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.



**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

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



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



**Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан



У Крагујевцу, 27.01. 2020. године