

03 Назив комисије: Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука у Крагујевцу

КРАГУЈЕВАЦ
Назив студије: „ГАЛЕКТИН 3, ST2 И ВИРУСНЕ ИНФЕКЦИЈЕ У ИМУНОПАТОГЕНЕЗИ ХРОНИЧНИХ ИНФЛАМАТОРНИХ БОЛЕСТИ“

Датум и број протокола: Студија без броја протокола, из марта 2014. Захтев заведен на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, под бројем 01-2630 од 18.03.2014.

Спонзор: Спонзор не постоји.

Главни истраживач: проф. др Небојша Арсенијевић, Српских Добровољаца 35/4, Крагујевац, Србија.
arne@medf.kg.ac.rs

На седници Етичке комисије од 19.03.2014. разматрани су следећи документи:

1. Протокол истраживања
2. Биографија главног истраживача
3. Сажетак студије
4. Молба за одобрење студије од 18.03.2014.

Врста и број животиња које ће бити коришћене у експериментима: мишеви соја BALB/c, старости од 6 до 8 недеља, 250 животиња; мишеви соја C57BL/6, старости од 6 до 8 недеља, 250 животиња

Закључак: СТУДИЈА ЈЕ ОДОБРЕНА ЗА ИЗВОЂЕЊЕ.

У свом раду Етичка комисија се придржава директиве Европске Уније број 2010/63/EU од 22.9.2010. године о заштити животиња које се користе у научне сврхе.

Председник Етичке комисије
доц. др Иван Јовановић

датум: 19.03.2014.

Чланови Етичке комисије:

1. доц. др Иван Јовановић, доктор медицине, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
2. проф. др Миодраг Стојковић, ветеринар, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
3. доц. др Сузана Поповић, молекуларни биолог, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
4. проф. др Сузана Пантовић, молекуларни биолог, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
5. доц. др Иванка Зелен, лекар специјалиста биохемије, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
6. доц. др Јасмина Миловановић, молекуларни биолог, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
7. асс. др Илија Јефтић, доктор медицине, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
8. асс. др Владимир Живковић, доктор медицине, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
9. сарадник Сања Бојић, доктор медицине, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
10. Душан Новаковић, спец. хем. биохем., члан невладине организације МЕДРАТ
11. Милош Стојановић, лаик, није запослен на Медицинском факултету у Крагујевцу
12. спец. др вет. Марко Радичевић, вет. хир., ветеринарска ординација Радичевић

Седници од 19.03.2014. присуствовали су:

1. доц. др Иван Јовановић
2. доц. др Сузана Поповић
3. проф. др Сузана Пантовић
4. проф. др Иванка Зелен
5. сарадник др Сања Бојић
6. асс. др Владимир Живковић
7. асс. др Илија Јефтић

Сви присутни чланови су донели горе наведени закључак и одобрили извођење ове студије.

Председник Етичке комисије
доц. др Иван Јовановић

датум: 19.03.2014.

Биографија
Александар Арсенијевић
доктор медицине

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. Школске 2012/13. уписао Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација.

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 „5th Course on Cytoskeleton: Cytoskeleton in Cell Organization“ на Институту Кири у Паризу.

Педагошко искуство:

Као студент две године учествовао у настави као демонстратор на предмету Патолошка анатомија.

Две године обавља посао сарадника у настави на предмету Микробиологија и имунологија, Основи онкологије и Клиничка имунологија. Изабран у звање асистента 2015 године.

Говори енглески језик.

Подаци о објављеним радовима

Категорија М20

- 1) Zdravkovic ND, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Arsenijevic AN, Zdravkovic ND, Mitrovic SLj, Arsenijevic NN. Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma. *Int J Med Sci.* 2014;11(9):936-47. (M22 = 5 бодова)

Категорија М30

- 1) Marija Z. Milovanovic, A.N. Arsenijevic, J.Z. Milovanovic, B. Stojanovic, N.N. Arsenijevic, M.L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, August 2013. Abstract book, pp 152. (M34 = 0,5 бода)
- 2) Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection

- facilitates EAE development in resistant BALB/c mice. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p79–80. 2014. (M34 = 0,5 бода)
- 3) Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p11–12. 2014. (M34 = 0,5 бода)
- 4) Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 75. M34=0,5 бода
- 5) Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Natasa Zdravkovic, Patrick Leung, Fu-Tong Liu, Erick Gershwin, Miodrag L. Lukic. Deletion of Galectin 3 Enhances Primary Biliary Cirrhosis in Mice by Enhanced Apoptosis of Biliary Epithelial Cells and Release of Autoantigens. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 43. M34=0,5 бодова
- 6) Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May, 2015. Abstract book p69. M34=0,5 бодова
- 7) J. Milovanovic, M. Milovanovic, A. Arsenijevic, B. Stojanovic, B. Popovic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, M. L. Lukic. MCMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 2015. Abstract book, pp 105. (M34 = 0,5 бодова)

Категорија М50

- 1) Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Eric M. Gershwin, Patrick Leung, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Xenobiotic

- induced model of primary biliary cirrhosis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150 (M52 = 1,5 бодова)
- 2) Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (4): 183-190 (M52 = 1,5 бодова)
 - 3) Žana Besser Silconi, Sasa Benazic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181-186 (M52 = 1,5 бодова)
 - 4) Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Marija Milovanovic, Miodrag L. Lukic. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res. Прихваћен за штампу и биће штампан у једном од наредних бројева часописа. DOI: 10.1515/SJECR-2015-0048, прилог одобрење. (M52 = 1,5 бодова)
 - 5) Sasa Benazic, Zana Besser Silconi, Jelena Milovanovic, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (4): 10-10.

XENOBIOTIC INDUCED MODEL OF PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS

Aleksandar Arsenijevic¹, Jelena Milovanovic¹, Bojana Stojanovic¹, Marija Milovanovic¹, Eric M. Gershwin²,
Patrick Leung², Nebojsa Arsenijevic¹, Miodrag L. Lukic¹

¹Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

²Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology, University of California, Davis, CA, USA

PRIMARNA BILIJARNA CIROZA INDUKOVANA KSENOBIOTIKOM: EKSPERIMENTALNI MODEL

Aleksandar Arsenijevic¹, Jelena Milovanovic¹, Bojana Stojanovic¹, Marija Milovanovic¹, Eric M. Gershwin²,
Patrick Leung², Nebojsa Arsenijevic¹, Miodrag L. Lukic¹

¹Centar za molekulska medicinu i ispitivanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

²Odeljenje reumatologije, alergologije i kliničke imunologije, Univerzitet u Kaliforniji, SAD

Received / Primljen: 15.06.2014.

Accepted / Prihvaćen: 22.06.2014.

ABSTRACT

Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune disease of the liver that is, characterised by destruction of the intrahepatic bile ducts and the presence of antimitochondrial antibodies (AMAs). Several murine models of PBC, with similar serological, biochemical, and histological features to human PBC, have been developed in recent years. These animal models enable investigators to study the etiology and pathophysiologic mechanism of PBC. Immune response in PBC is directed towards E2 components of the 2-oxo-acid dehydrogenase family of enzymes, which is in located in mitochondria and is an immunodominant epitope (a lipoylated peptide sequence shared by enzymes). Immunisation of mice with 2-octynoic acid coupled to bovine serum albumin (2-OA-BSA) (which is an antigen that is structurally related to the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex [PDC-E2]) produces histologic features similar to those found in human PBC. This model of xenobiotic induced PBC is suitable for studying the early events in PBC pathogenesis and for developing new therapeutics in PBC.

Key words: PBC, xenobiotic, 2OA-BSA, C57BL/6 mice

SAŽETAK

Primarna bilijarna ciroza (PBC) je autoimunska bolest jetre koju karakteriše destrukcija intrahepatičnih žučnih kanalića i prisustvo antimitohondrijalnih antitela (AMAs). Poslednjih godina je razvijeno nekoliko mišjih modela PBC koji imaju slične serološke, biohemijske i histološke karakteristike kao i humana PBC. Ovi animalni modeli su omogućili ispitivanje etiologije i mehanizama uključenih u patogenezu PBC. U PBC imunski odgovor je usmeren na E2 komponentu 2-okso-kiselina dehidrogenaza familije enzima koji su locirani u mitohondrijama, a imunodominantni epitop je peptidna sekvenca sa lipidima koja je zajednička za ove enzime. Imunizacija miševa 2-oktinoičnom kisleinom vezanom za goveđi serumski albumin (2-OA-BSA), antigenom koji je strukturno sličan E2 subjedinici kompleksa piruvat dehidrogenaze (PDC-E2), omogućava razvoj histoloških promena koje karakterišu PBC kod ljudi. Ovaj model PBC indukovano ksenobiotikom je pogodan za ispitivanje početnih događaja u patogenezi PBC i za razvoj novih lekova za PBC.

Ključne reči: PBC, ksenobiotik, 2OA-BSA, C57BL/6 miševi



INTRODUCTION

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a liver-specific autoimmune disease (1). PBC has a long latency period, which is followed by the development of common symptoms: fatigue, pruritus hyperpigmentation, and (in the terminal stages) bleeding varices, and ascites (2). PBC is characterised by a multilineage humoral and cellular adaptive response against biliary epithelial cells (BECs) and destruction of small bile ducts by mechanisms that include innate immune responses (3; 4). Bile duct destruction leads to cholestasis, fibrosis, and ultimately liver cirrhosis (4). The typical characteristic of the disease is the presence of an-

timitochondrial autoantibodies (AMA), which are present in high amounts. The autoantigens to which the immune response is directed in PBC has been identified as the E2 subunits of the 2-oxo-acid dehydrogenase complexes (2OADC-E2), including the E2 subunits of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2), branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC-E2), and 2-oxo-glutarate dehydrogenase complex (OGDC-E2) (5). The immunodominant autoantigen within this group is PDC-E2 (6; 7). A multi-faceted immune response to the immunodominant mitochondrial autoantigen PDC-E2 in PBC



UDK: 616.36-097 / Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150

DOI: 10.2478/SJECR-2014-0019

Correspondence: Marija Milovanovic, MD PhD; Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; Phone: +38134306800, Fax: +38134306800112
E-mail: marijaposta@gmail.com



suggests that a loss of tolerance to PDC-E2 is the initiating event in the development of PBC; there is no significant evidence of epitope spreading, which is present in other autoimmune diseases (8).

ETIOPATHOGENESIS OF PBC

The etiology of PBC, including the loss of tolerance, is still unknown. However, as in all autoimmune diseases, it is likely that genetic susceptibility and environmental factors play a role in the pathogenesis (9). Environmental factors, including xenobiotics or microorganisms, modify the autoantigen and facilitate the breakdown of tolerance (10).

Molecular mimicry: Cross-reactivity between sera of PBC patients and *E. coli* has been shown, but stronger reactivity (1,000-fold stronger than with *E. coli*) has been demonstrated with the xenobiotic-metabolising gram-negative bacterium *Novosphingobium aromaticivorans* (a bacterium present in human fecal specimens) (11). *N. aromaticivorans* contains two proteins highly homologous to the immunodominant epitope of PDC-E2 and serum autoantibodies. Importantly, mice infected with *N. aromaticivorans* develop PBC-like liver lesions (12).

Xenobiotics: Because the liver plays a key role in the metabolism of toxins, the hepatocytes and BECs are continuously exposed to chemical by-products. Associations between PBC and the frequent use of nail polish support a xenobiotic pathogenesis hypothesis. 2-Octynoic acid is a food additive and xenobiotic that is present in cosmetic products, such as nail polish. The *in vitro* and *in vivo* data strongly support a potential role of 2-octynoic acid in PBC. Reactivity of 2-octynoic acid with AMAs and lipoic acid has been shown (13). Congenic nonobese diabetic NOD.1101 (NOD.B6 Idd10 Idd18r2) C57BL/6 mice, immunised with 2-octynoic acid conjugated with bovine serum albumin, develop histological features of autoimmune cholangitis (portal infiltrates enriched in CD8+ cells and liver granulomas); these mice demonstrated high titers of AMAs (14-17). This model provides convincing evidence that xenobiotics are causally related to the development of PBC.

Biliary epithelial cells

The most intriguing aspect of the pathogenesis of PBC remains the specific immune response directed at the small intrahepatic bile ducts, as all nucleated cells have mitochondria with 2-oxo-acid dehydrogenase complexes. These small biliary ducts are lined with biliary epithelial cells, BECs (i.e., cholangiocytes) and are destroyed by the immune response, mediated by specific CD4+ and CD8+ T cells (18; 19). This selective destruction indicates there are unique immunopathological characteristics of BECs. It is known that BECs are not passive bystanders in primary biliary cirrhosis; these cells can increase the expression of adhesion molecules and production of TNF- α , IFN- γ , and IL-1 upon stimulation with proinflammatory cytokines (20). Through the variable expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, BECs can modulate

the degree and localization of the inflammatory process. Additionally, BECs have properties of antigen presenting cells by expressing HLA class II and costimulatory molecules CD80 and CD86. Based on these characteristics of BECs, it can be hypothesized that their interactions with T cells may be responsible for bile duct damage.

BECs of small bile ducts are very susceptible to apoptosis, more than epithelial cells of larger ducts (due to a lack of production of specific protease-resistant peptides, trefoils) (21). Moreover, unique characteristics of apoptosis in BECs indicate that this process most likely plays a part in the immunopathogenesis of PBC. Autoreactive lymphocytes may be activated with neo-antigens arise from apoptotic BECs (22). When BECs undergo apoptosis, the major mitochondrial autoantigen, PDC-E2, remains immunologically intact, whereas other cells following apoptosis present a form of PDC-E2 that cannot be detected by AMAs (23; 24). Persistent exposure to PDC-E2, as derived from BECs, is caused by a failure to covalently link PDC-E2 to glutathione during the course of apoptosis in these cells. Another important observation regarding the role of apoptotic BECs in the pathogenesis of PBC is the high degree of proinflammatory cytokine production in monocyte-derived macrophages that was found in PBC patients who were incubated with apoptotic bodies from BECs (in the presence of AMAs) (25). It is important to note that the BECs used in these experiments were derived from two normal donors, which implies that there is no phenotype of biliary epithelial cells specific for PBC; this could explain the recurrence of PBC following transplantation (26).

Immunostaining of PBC biliary tract with monoclonal antibodies against mitochondrial autoantigens demonstrated a high degree of expression of PDC-E2 at the apical surface of the small bile duct cells lining the bile duct lumen (27; 28). Cholangiocytes play a role in the transport of IgA antibodies in bile duct lumen. PDC-E2-specific IgA enters the BECs via a polyimmunoglobulin receptor and forms a complex with PDC-E2; it may thereby contribute to the exposure of PDC-E2 at the apical surface of BECs. Additionally, during transcytosis through cells expressing polyimmunoglobulin receptors, dimeric IgA can initiate the activation of caspases (29). The levels of anti-PDC-E2 IgA antibodies in PBC sera directly correlate with the level of caspase activation.

IMMUNE RESPONSE IN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS

The mechanism of biliary destruction has not been completely determined, but the specificity of pathological changes in the bile ducts, the presence of lymphoid infiltration in the portal tracts, and the presence of major-histocompatibility-complex class II antigens on the biliary epithelium indicate that an intense immune response is directed against the biliary epithelial cells. There are data suggesting that the destruction of biliary cells is mediated by liver-infiltrating autoreactive T cells (19; 30). CD4+ and



CD8+ T cells can be detected in the portal tracts of PBC patients (19; 31-33). An increased serum level of autoantibodies specific for PDC-E2 is accompanied by a 100 times higher frequency of antigen-specific CD4+ T cells and a 10 times higher frequency of antigen-specific CD8+ T cells in liver as compared to with draining lymph nodes. Two important T helper cell subpopulations shown to have a role in the pathogenesis of PBC are Th17 and Treg cells (34). Significantly lower levels of CD4+ CD25high are detected in the peripheral blood of PBC patients and their family members. In addition, FoxP3+ Treg cells can be detected in the lymphoid infiltrates found in the portal tracts (35). Th17 cells have a pathogenic role in PBC: an increased frequency of IL-17-positive lymphocytes was found in liver tissues from patients with PBC, and in the IL-2R α KO mouse model of autoimmune biliary disease (36).

There is granulomatous inflammation in the liver of PBC patients that is accompanied by an increased production of polyclonal IgM antibodies. Cultured human BECs express toll like receptors (TLRs), lipopolysaccharide, and lipoteichoic acids, which are present in bile. The expression of TLRs in BECs is mediated through biliary injury via the NF- κ B pathway (37). In response to TLR stimulation, BECs may produce proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and chemokines IL-8 and CX3CL1. CX3CL1 is a chemoattractant for cells expressing its receptor, CX3CR1. In PBC patients, CX3CR1 expressing CD8+ and CD4+ T cells can be found in the portal tracts and within the biliary epithelial layer of injured bile ducts (38). Another cell type known to be involved in PBC pathogenesis are NKT cells. There is a higher frequency of CD1d-restricted NKTs in PBC patients. These cells are more frequently found in the liver than in the peripheral blood. An increased number of CD1d-restricted NKT cells was found in the liver of the dnTGF- β RII mouse model (39). These CD1d-restricted NKT cells in the liver had increased IFN- γ production following exposure to α -galactosylceramide; this was accompanied by a decrease in hepatic lymphoid cell infiltration and less cholangitis when compared to the controls.

ANIMAL MODELS OF PBC

Over the past several years, several animal models for PBC have been developed. Severe combined immunodeficient (SCID) mice develop lymphocytic infiltration around small bile ducts and present with the anti-PDC-E2 antibodies following the transfer of lymphocytes from peripheral blood of PBC patients (40). Congenic NOD.c3c4 mice are obtained by replacing the diabetes-susceptibility genes on chromosomes 3 and 4 with the diabetes-resistance genes of B6 and B10 mice (41). Overall, 50% to 60% of these mice develop autoimmune cholangitis and demonstrate AMA antibodies in their serum. Histologically, however, the cyst-like dilatation of the affected bile duct, which is characteristic of these mice, is not observed in PBC patients; when the dilatation becomes severe, the biliary epithelium of NOD.c3c4 mice frequently exfoliates, which can trigger neutrophil in-

filtration that is not characteristic of human disease. Another mouse model for PBC is the dnTGF- β RII mouse. These mice over express the dominant-negative form of TGF- β receptor II under the control of the CD4 promoter. A deficiency of TGF- β signalling causes various immunological abnormalities, including colitis. dnTGF- β RII mice exhibit major serological and histological characteristics of human PBC (42), indicating an important role of the TGF- β signalling pathway in the pathogenesis of PBC. Serologically, specific AMA production occurs in all mice, and histologic hepatic lesions typical of PBC (lymphocytic infiltration, interlobular bile duct destruction, and granuloma formation in the portal tract) appear at an increased frequency. Immune infiltrating cells (including B cells, plasmacytoid dendritic cells, natural killer (NK) cells, and macrophages), CD4+ cells, and CD8+ T cells are found in the portal tracts. In IL-2R α -/- mice (43), the IL-2 signal, which is important for controlling the fate of mature T cells, is functionally blocked. These mice develop an inflammatory bowel disease and an autoimmune lymphoproliferative disease. Anti-PDC-E2 antibodies are present in the sera of all IL-2R α -/- mice. There is increased lymphocytic infiltration in the portal tract and damage of the interlobular bile duct. CD8+ T cells are predominant among the infiltrating lymphocytes, and there is an increase in the number of CD4+ T and B cells. In addition, a small number of granulomas is formed. Increased levels of inflammatory cytokines, including TNF- α , IFN- γ , IL-12p40, and IL-6, are also observed. Using a model produced by crossing IL-2R α -/- mice with CD4 KO and CD8 KO mice, Hsu et al. (44) showed that CD8+ T cells participate in the pathogenesis of PBC.

XENOBIOTIC INDUCED PBC

The autoantigens of the E2 enzymes have a common structure consisting of a single N-terminal catalytic domain, containing two binding sites for the covalently attached lipoic acid cofactor. These lipoyl binding domains are the epitopes that are recognized most often by AMAs (8), suggesting an essential role of the lipoic acid domain in the etiology of PBC. The immune reactivity of AMAs are directed against a conformational epitope that is susceptible to chemical modification. This finding indicates that self-tolerance may be interrupted by chemical modification of the lipoyl domain of PDC-E2 by xenobiotics. It has been demonstrated that the modified lipoyl domain of PDC-E2 specifically binds antibodies in PBC sera, often at levels higher than the native PDC-E2 molecule (45-47). These mimicking effects are found in compounds that are widely used in the environment (including perfumes, lipstick, and many common food flavorings) (45). Studies have shown that animals immunised with selected AMA-positive xenobiotics resulted in AMAs; these animals developed liver pathology similar to PBC (48; 49).

It has been reported that B6 and NOD.1101 (NOD. B6 Idd10 Idd18r2) mice immunised with 2-octynoic acid

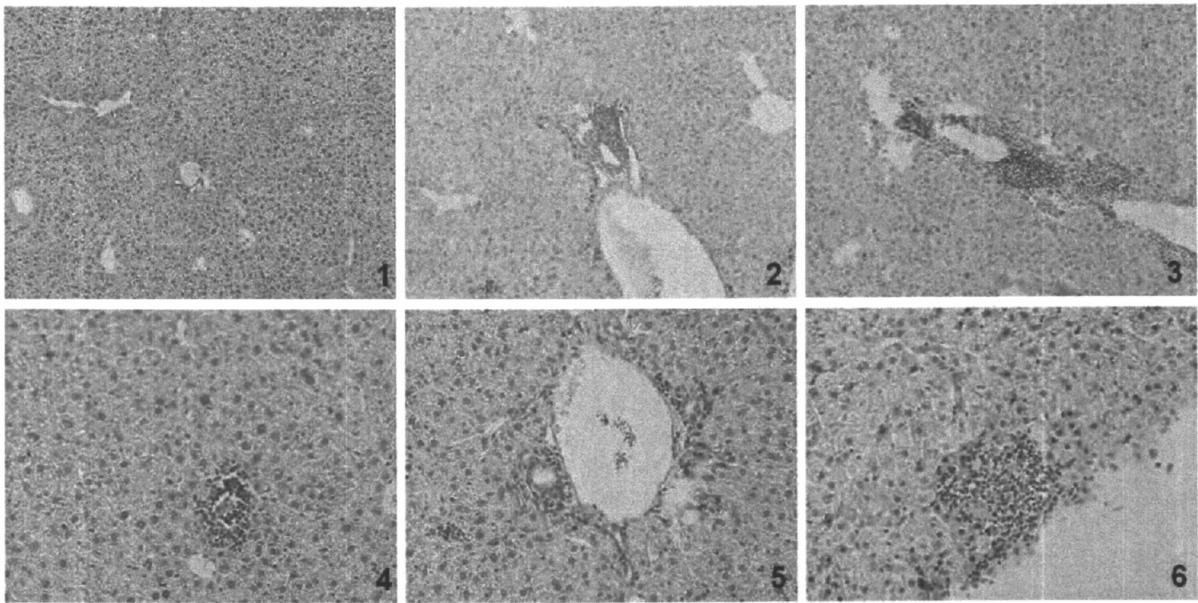


Figure 1. Histological features of the C57BL/6 mice 8 weeks after immunization with 2OA-BSA and control mice. Different degrees of lymphocytic infiltration: 1) untreated mice; 2) portal infiltration with granuloma formation; 3) parenchymal infiltration; 4) parenchymal granuloma; 5) moderate portal infiltration; 6) subcapsular abscess (H&E staining).

(2-OA), coupled to BSA, had high AMA titers, portal inflammation, and cholangitis similar to human PBC (14).

We used this xenobiotic induced PBC model to explore, in detail, the histological characteristics of the liver.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Female C57BL/6 mice were maintained at the animal facilities of the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac. All animal procedures were approved by the ethical committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

Primary biliary cirrhosis was induced as previously described (14). Briefly, a mixture of BSA conjugated 2-ocynoic acid (2OA-BSA; 100 µg/100 µL in PBS) was injected

intraperitoneally with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), containing 1 mg/mL of Mycobacterium tuberculosis (strain H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). This was subsequently boosted every two weeks with 2OA-BSA in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Additionally, mice intraperitoneally received 100 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA) at the time of initial immunisation with 2OA-BSA in Complete Freund's Adjuvant.

Immediately following sacrifice, liver tissue was harvested, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 4-µm sections for routine hematoxylin and eosin (H&E) staining. Evaluation under light microscopy and scoring of liver inflammation and bile duct damage was performed on coded H&E-stained sections in a

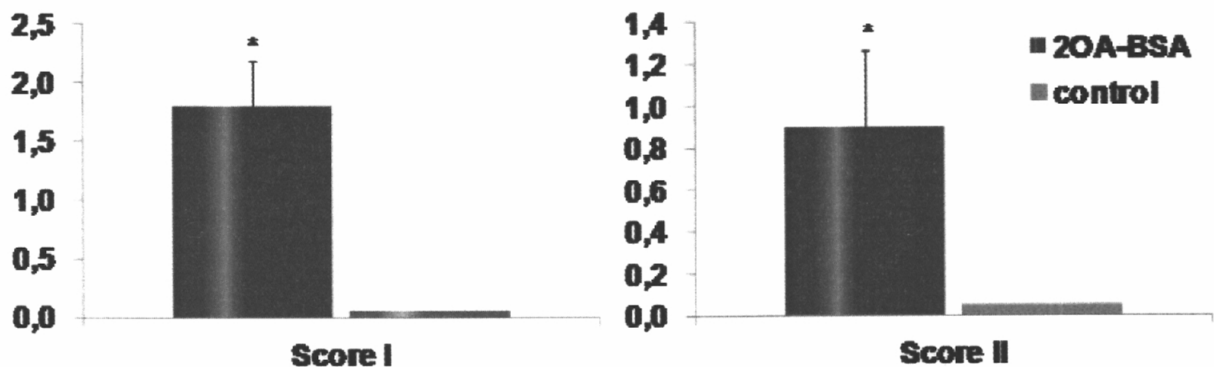


Figure 2. C57BL/6 mice immunized with 2OA-BSA develop significant infiltrates in the liver. Mean values + SD for histopathological scores I and II per group (2OA-BSA immunised and control) are presented. 0 = no significant change, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, and 4 = severe pathology * p<0.05.



blinded fashion. The images were captured with a light microscope (Olympus) equipped with a digital camera.

Sections were evaluated for periportal inflammation, infiltration of bile ducts without damage, infiltration and damage of bile ducts, and subcapsular infiltrates. Based on the level of pathology, the indices were scored as 0, no; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; or 4, very severe pathology. Score I was calculated as the mean value of each scored index. Granulomas, and fibrosis were scored as 0, no; 1, mild; 2, moderate; or 3, severe pathology; based on these values, score II was calculated.

All mice immunised with 2OA-BSA (9/9) developed histological findings typical of PBC (Figure 1). Our histological scoring clearly demonstrates the disease in the group of 2OA-BSA immunised mice (Figure 2).

The autoimmune cholangitis induced by 2OA-BSA immunisation recapitulates the histological features of human PBC: portal-tract inflammation with destruction bile ducts, focal-duct obliteration with granuloma formation, periportal extension of inflammation, and fibrosis. Importantly this model of autoimmune cholangitis gives us the opportunity to study the early events of PBC pathogenesis and to explore the possibility of new PBC therapeutics.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants No. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia and The Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14). No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

- Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005; 353(12): 1261-1273.
- Bergasa NV. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003; 7: 879-900.
- Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2011; 377: 1600-1609.
- Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology.* 2008; 47(2): 737-745.
- Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol.* 2013; 8: 303-330.
- Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1965; 1: 827-831.
- Fussey SP, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 8654-8658.
- Moteki S, Leung PS, Dickson ER, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology.* 1996; 23(3): 436-444.
- Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* 2012; 39(4): 259-271.
- Selmi C, Leung PS, Sherr DH, Diaz et al. Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: a National Institute of Environmental Health Sciences expert panel workshop. *J Autoimmun.* 2012; 39(4): 272-284.
- Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, et al. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology.* 2003; 38(5): 1250-1257.
- Mattner J, Savage PB, Leung P, et al. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe.* 2008; 3(5): 304-315.
- Rieger R, Leung PS, Jeddeloh MR, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006; 27(1): 7-16.
- Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, et al. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology.* 2008; 48(2): 531-540.
- Wakabayashi K, Yoshida K, Leung PS, et al. Induction of autoimmune cholangitis in non-obese diabetic (NOD).1101 mice following a chemical xenobiotic immunization. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155(3): 577-586.
- Ambrosini YM, Yang GX, Zhang W, et al. The multi-hit hypothesis of primary biliary cirrhosis: polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol.* 2011; 166(1): 110-120.
- Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, et al. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology.* 2011; 53(3): 915-925.
- Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev.* 2000; 174: 210-225.
- Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest.* 2002; 109(9): 1231-1240.
- Chuang YH, Lan RY, Gershwin ME. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol.* 2009; 31(3): 323-331.
- Kimura Y, Leung PS, Kenny TP, et al. Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2002; 36(5): 1227-1235.
- Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(21): 3328-3337.



23. Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest.* 2001; 108(2): 223-232.
24. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, et al. Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2009; 49(3): 871-879.
25. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, et al. Biliary apoptosis and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 52(3): 987-998.
26. Van de Water J, Gerson LB, Ferrell LD, et al. Immunohistochemical evidence of disease recurrence after liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1996; 24(5): 1079-1084.
27. Van de Water J, Turchany J, Leung PS, et al. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest.* 1993; 91(6): 2653-2664.
28. Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, et al. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology.* 1995; 21(4): 1031-1037.
29. Matsumura S, Van De Water J, Leung P, et al. Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2004; 39(5): 1415-1422.
30. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology.* 2002; 123(4): 1031-1043.
31. Kita H, Lian ZX, Van de Water J, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195(1): 113-123.
32. Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2008; 31(2): 110-115.
33. Van de Water J, Ansari A, Prindiville T, et al. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp Med.* 1995; 181(2): 723-733.
34. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, et al. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol.* 2010; 184(6): 2886-2898.
35. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 43(4): 729-737.
36. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2009; 32(1): 43-51.
37. Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Interferon gamma accelerates NF-kappaB activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligand interaction. *J Clin Pathol.* 2006; 59(2): 184-190.
38. Shimoda S, Harada K, Niino H, et al. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 51(2): 567-575.
39. Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, et al. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2008; 47(2): 571-580.
40. Krams SM, Dorshkind K, Gershwin ME. Generation of biliary lesions after transfer of human lymphocytes into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Exp Med.* 1989; 170(6): 1919-1930.
41. Irie J, Wu Y, Wicker LS, et al. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J Exp Med.* 2006; 203(5): 1209-1219.
42. Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, et al. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol.* 2006; 177(3): 1655-1660.
43. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 44(5): 1240-1249.
44. Hsu W, Zhang W, Tsuneyama K, et al. Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology.* 2009; 49(1): 133-140.
45. Amano K, Leung PS, Rieger R, et al. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol.* 2005; 174(9): 5874-5883.
46. Naiyanetr P, Butler JD, Meng L, et al. Electrophile-modified lipoic derivatives of PDC-E2 elicits anti-mitochondrial antibody reactivity. *J Autoimmun.* 2011; 37(3): 209-216.
47. Rieger R, Leung PS, Jeddloh MR, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006; 27(1): 7-16.
48. Leung PS, Park O, Tsuneyama K, et al. Induction of primary biliary cirrhosis in guinea pigs following chemical xenobiotic immunization. *J Immunol.* 2007; 179(4): 2651-2657.
49. Leung PS, Quan C, Park O, et al. Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies. *J Immunol.* 2003; 170(10): 5326-5332.

	05. 11. 15		
05	11621/1		

Под пуном моралном, материјалном и кривичном одговорношћу

ИЗЈАВЉУЈЕМ

да су подаци изнети у Образложењу теме докторске дисертације под насловом:


"Значај ексцесије Галетица-3 у патогенези
примарне билатералне урозе код мишева"

моје ауторско дело, да сам без ограничења носилац ауторских права над њима (у складу са Законом о ауторском и сродним правима – "Сл.лист СЦГ" бр.61/2004) и да њиховим коришћењем не вређам права трећих лица.

Крагујевац

5.11.2015

Давалац изјаве-кандидат

Александар Арсенијевић 

бр.досијеа 137/2012

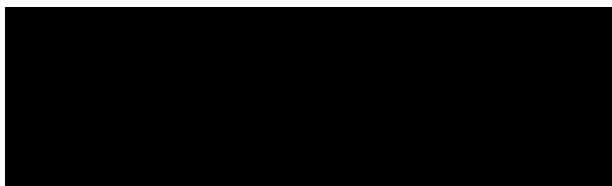
Значај експресије галектина-3 у патогенези примарне билијарне цирозе код мишева

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВО

Александар Арсенијевић, асистент за ужу научну област Онкологија

Изборно подручје: ИП4 (Имуност, инфекција и инфламација)

Адресе:



ПРИЈАВА ЗА: 05 11 15			
Држава	Број	Подноносилац	
05	11629		

потенцијални ментор: Марија Миловановић, Доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија

САЖЕТАК

Увод: Галектин-3 (Gal-3) игра кључну заштитну улогу у инфективним и аутоимунским запаљењским реакцијама. Полазећи од тезе да је апоптоза епителних ћелија жучних каналића (енгл. *Biliary Epithelial Cells*, BECs) критичан догађај у патогенези примарне билијарне цирозе (енгл. *Primary Biliary Cirrhosis*, PBC), а предпостављајући да појачана експресија Gal-3 може заштитити ове ћелије од апоптозе, у изради ове студије испитиваће се улога Gal-3 у моделу мишјег аутоимунског холангитиса, експерименталног модела за примарну билијарну цирозу.

Циљ: Утврдити улогу галектина-3 у патогенези мишјег аутоимунског холангитиса.

Метод: Као експерименталне животиње користиће се Gal-3 дефицијентни мишеви (или енгл. *Gal-3 knockout mice*, Gal-3^{-/-}) и Gal-3 позитивни мишеви соја C57BL/6, старости до 12 недеља. Животиње ће бити имунизоване мимотопом митохондријског аутоантигена: 2-октаноичне киселине (2-ОА) повезане са албумином говеђег серума (енгл. *Bovine Serum Albumin*, BSA), који покреће развој PBC, а настала болест ће се дијагностиковати мерењем нивоа антитета на PDC-E2 и имунохистохемијском анализом исечака јетре. Испитаће се и фенотип лимфоцита који инфилтришу јетру, функционални статус ћелија које презентују антиген и експресија Gal-3 у билијарним епителним ћелијама и процена апоптозе ових ћелија.

Очекивани резултати: Очекује се да мишеви са делецијом гена за Gal-3 развијају значајно тежу форму индукованог аутоимунског холангитиса, са израженијом перипортном инфилтрацијом, већим оштећењем билијарних каналића и следственим настанком гранулома и фиброзе.

Очекивани закључак: Gal-3 игра критичну улогу у заштити билијарних епителних ћелија од инфламацијске деструкције.

Кључне речи: PBC, ксенобиотик, Gal-3, апоптоза, BECs

УВОД

Gal-3, члан фамилије лектина, присутан је у различитим типовима ћелија укључујући и ћелије имунског система, модулира како стечени тако и урођени имунски одговор (1). Овај лектин је укључен у патогенезу многих хроничних инфламацијских и малигних болести (2,3). Епителне ћелије нормалних интрахепатичних жучних каналића конститутивно експримирају низак ниво галектина-3, а експресија се снажно повећава у неким патолошким стањима као што је интрахепатични холангиокарцином (4). Овај молекул може имати проапоптотску али је много чешће саопштена његова антиапоптотска улога (4). Повећана експресија Gal-3 у кератиноцитима након излагања UV зрацима штити ове ћелије од апоптозе (5). Ови налази о функцији Gal-3 могу бити важна за патогенезу PBC, коју карактерише имунски одговор на главни митохондријски аутоантиген- PDC-E2. Објављене су обимне студије о узроцима и развоју ове болести, укључујући и оне које истражују различите путеве укључене у имунопатологију болести код мишева и код људи (6, 7). Подаци из поменутих студија постављају неколико основних принципа. Прво, јасно је документована генска предиспозиција. Друго, изгледа да имунски одговор игра различите улоге зависно од стадијума болести. Треће, иако је болест учесталија код жена то не мора бити последица само присуства полних хормона већ и епигенетских догаја на X хромозому (8, 9).

Интересантна је и претпоставка да BECs нису само неми посматрачи развоја PBC, већ да под стимулацијом могу утицати на ток и снагу запаљењског процеса и то како експресијом различитих адхезионих и костимулацијских молекула тако и секрецијом проинфламацијских цитокина (TNF- α , IFN- γ и IL-1) (10). Показано је и да су ове ћелије подложне апоптози (11), а током овог процеса главни митохондријски антиген, PDC-E2, остаје неизмењен (12) и бива експримиран на луменској површини епителних ћелија жучних каналића (13). Антиген/и потекли из апоптозома ослобођених из BECs могу активирати аутореактивне лимфоците (14). Такође, апоптотичне BECs могу стимулирати макрофаге да синтетишу и секретују проинфламацијске цитокине (15). Животињски модел болести подразумева имунизацију са 2-октаноичном киселином (2-OA) повезаном са BSA. Овако изазвану благу болест карактерише повећана концентрација антимитохондријских антитела (AMAs) у серуму, портна инфламација и холангитис, што одговара и налазу код људи оболелих од PBC (16). До данас није истражена улога Gal-3 у патогенези болести а може се предпоставити да би у одсуство овог молекула болест имала тежи ток. Планирано истраживање могло би да понуди одговор каква је улога овог молекула у развоју PBC.

ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог истраживања је да се утврди улога Gal-3 у патогенези PBC коришћењем мишева дефицијентних у експресији Gal-3.

У складу са основним циљем постављени су и следећи **експериментални задаци**:

- Утврдити утицај недостатка гена за Gal-3 на тежину болести, мерењем параметара PBC
- Испитати разлике у саставу инфилтрата у јетри мишева са делецијом гена за Gal-3 и мишева који имају функционални ген за Gal-3
- Испитати утицај Gal-3 на функционални статус дендритских ћелија у инфилтратима јетре мишева имунизованих ксенобиотиком
- Упоредити серумске цитокинске профиле и доминантан имунски одговор (Th1, Th2 и Th17) лимфоцита који инфилтришу јетру имунизованих Gal-3 дефицијентних и WT мишева
- Истражити везу између експресије Gal-3, степена апоптозе BECs и тежине болести

Радна **хипотеза** испитивања: одсуство Gal-3 подстиче инфламацију и повећава оштећење ткива

ВРСТА СТУДИЈЕ

Експериментална студија

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ:

Експерименталне животиње. Истраживање ће се обавити на мишицама соја C57BL/6 (*wild type*, WT) и Gal-3^{-/-} дефицијентним мишицама на C57BL/6 подлози, старим 8 недеља. 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 рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Индуковање РВС, дијагноза и праћење тока болести.

Примарну билијарну цирозу ћемо изазвати као што је раније описано (16). Узорци серума ће се прикупљати друге, четврте и 8. недеље после иницијалне имунизације са 2ОА-BSA. У серумима ће се одређивати концентрација антитела на PDC-E2, коришћењем ELISA технике (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) како је то раније описано (16). Исечци узорака ткива, добијени након жртвовања животиња, ће се након стандардног третмана бојити хематоксилином и еозином (H&E) и у њима микроскопском анализом регистровати перипортна инфламација, инфилтрација билијарних каналића са и без оштећења као и субкапсуларни инфилтрати. Свака од поментих патолошких промена ће бити оцењиване са: 0 = неизмењено; 1 = благе; 2 = умерене; 3 = изражене и 4 = врло изражене. Хистолошки индекс I биће израчунаван као средња вредност свих оцењених промена. Поред тога оцењиваће се и присуство гранулома и фиброзе и то: 0 = нема; 1 = благе; 2 = умерене; 3 = изражене, а хистолошки индекс II ће бити израчунаван на основу тих вредности.

Исечци ће се бојити још и Сиријус црвеном бојом и то тако што ће се након рехидрације третирати 0.1% раствором боје *Sirius Red F3BA* у засићеној пикринској киселини (*Sigma-Aldrich, St. Louis*), у трајању од једног сата. Потом ће се исечци два пута потапати у закишељену воду и три пута у 100% етанол, да би најзад били опрани ксилолом. Процена степена фиброзе у исечцима мишјих јетри, обојених на овај начин, обавиће се коришћењем програма ImageJ (*National Institute of Health, Bethesda, MD*) на 10 видних поља по исечку.

Мерење цитокина. Концентрације цитокина ће се мерити употребом мишјег сета за IL-17, IL-13, and IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) према упутствима произвођача.

Имунохистохемијске анализе. Депарафинисани исечци ће се инкубирати са зечјим моноклонским антителима за мишји цитокератин-7 (CK-7) и Gal-3. Везана антитела се визуализују помоћу конјугата специфичног за зечја антитела (*Expose Rb-Specific HRP/DAB*

Detection ИHC Kit; *Abcam*) и фотомикрографисањем помоћу дигиталне камере повезане са светлосним микроскопом (*Olympus BX51*).

Изоловање инфилтришућих мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија.

Ћелије ће бити издвојене из ткива јетре као што је то раније описано (2). Мононуклеарне ћелије ће бити регистроване помоћу моноклонских антитела (обележених флуоресцентним бојама) и то за: CD4, CD8 α , TCR β , F4/80, CD11c, CD19, I-A/I-E, CD86, IL-12, TNF α , IL-17, IFN- γ (*BD Biosciences*). За интрацелуларна бојења, ћелије ће претходно бити активисане РМА/јономицином. Обележене ћелије ће бити анализирани помоћу FACSCalibur проточног цитометра (*BD Biosciences*) а анализа обављена коришћењем програма *FlowJo* (*Tree Star*).

Изоловање VECs и детектовање апоптозе. За изоловање ових ћелија користиће се перфузија јетре у два корака. Након перфузије хепатоцити ће бити селективно уклоњени благим протискивањем кроз инцизију начињену на јетриној капсули. Преостале ћелије ће бити суспендоване у обогаћеном DMEM медијуму. Након десетодневне култивације овако изолованих ћелија оне ће бити изложене јономицину (1 $\mu\text{g/ml}$) у трајању од 22 сата. Процент апоптотичних ћелија ће бити одређен проточном цитометријом уз помоћ Annexin V FITC Detection Kit (*BD Pharmingen, San Jose, CA*).

СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима хистолошког скорa и серумске концентрације IL-6, IFN- γ , IL-13 и IL-17 и процента дендритских ћелија изолованих из јетре добијених у прелиминарном експерименту. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), 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 (за проценат дендритских ћелија у јетри), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 43 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's t* тест за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 18.

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Добијени резултати ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне девијације (или стандардне грешке). Статистичка значајност ће се одређивати *Student*-овим t тестом, а по потреби и *Mann-Whitney*-евим U test. Статистичка значајност ће бити предпостављена за $p=0.05$. Све статистичке анализе ће бити обављене употребом програма SPSS 18.0.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ И ЗНАЧАЈ СТУДИЈЕ:

Очекује се да делеција гена за Gal-3, у експерименталном мишјем моделу РВС, интензивира болест, да појачава портну инфламацију и фиброзу. Познато је да су епителне ћелије без Gal-3^{-/-} знатно подложније апоптози па се очекује израженија апоптоза билијарних епителних ћелија Gal-3^{-/-} мишева након имунизације ксенобиотиком који стимулише имунски посредовано оштећење ових ћелија. Интензивнију апоптозу билијарних епителних ћелија прати интензивније ослобађање аутоантигена што резултира појачаном стимулацијом ћелија које презентују антиген и последичном интензивнијом активацијом аутореактивних лимфоцита и интензивирањем аутоимунског процеса.

Овим испитивањем би истражили нове имунопатогенетске механизме примарне билијарне цирозе и евентуално указали на нове терапијске мере у лечењу почетних фаза примарне билијарне цирозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev* **230**, 114-127 (2009).
2. 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* **55**, 1954-1964 (2012).
3. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 deficiency

- accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* **62**, 1932-1944 (2013).
4. Shimonishi T, Miyazaki K, Kono N, Sabit H, Tuneyama K, Harada K, Hirabayashi J, Kasai K, Nakanuma Y. Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* **32**, 302-310 (2001).
 5. Saegusa J, Hsu DK, Liu W, Kuwabara I, Kuwabara Y, Yu L, Liu FT. Galectin-3 protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis by enhancing AKT activation and suppressing ERK activation. *J Invest Dermatol* **128**, 2403-2411 (2008).
 6. Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol* **8**, 303-330 (2013).
 7. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* **353**, 1261-1273 (2005).
 8. Hirschfield GM, Siminovitch KA. Genetics in PBC: what do the "risk genes" teach us? *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 176-181 (2015).
 9. Sun Y, Haapanen K, Li B, Zhang W, Van de Water J, Gershwin ME. Women and primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 285-300 (2015).
 10. Chuang YH, Lan RY, Gershwin ME. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol* **31**, 323-331 (2009).
 11. Kimura Y, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nishioka M, Giraud AS, Neuberger J, Benson G, Kaul R, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **36**, 1227-1235 (2002).
 12. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Mackay IR, Gores GJ, Ansari AA, Van de Water J, Gershwin ME. Apoptoses and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **49**, 871-879 (2009).
 13. Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, De Lellis R, Coppel R, Ansari A, Gershwin ME. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology* **21**, 1031-1037 (1995).
 14. Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* **14**, 3328-3337 (2008).
 15. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, Ansari AA, Coppel RL, Worman HJ, Gores GJ, Gershwin ME. Biliary apoptoses and anti-

mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **52**, 987-998 (2010).

16. Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, Moritoki Y, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Yoshida K, Yang GX, Hibi T, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology* **48**, 531-540 (2008).

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
Број: 01-11965/6
Дана: 16. 11. 2015. године
Крагујевац

На седници Комисије за претходна питања Факултета медицинских наука,
одржаној 12. 11. 2015. године, утврђен је

ЗАКЉУЧАК

Кандидат Александар Арсенијевић, испуњава услов за пријаву теме докторске
дисертације, утврђен општим актима Факултета и Универзитета.

ДЕКАН



Предраг Чановић
проф. др Предраг Чановић

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ
Број: 01-12209/3-4
Датум: 25. 11. 2015. године
К р а г у ј е в а ц

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу одржаној дана 25. 11. 2015. године донета је

О Д Л У К А

Формира се Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под називом:

ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНЕ БИЛИЈАРНЕ ЦИРОЗЕ КОД МИШЕВА

кандидата Александра Арсенијевића, у саставу:

1. проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан
3. доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.


ПРЕДСЕДАВАЈУЋИ ВЕЋА
проф. др Предраг Чановић, декан

Достављено:
-Кандидату
-Архиви

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ
НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИЈЕМАЊИ	20.01.16		
Служба			
65	458		

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

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-12209/3-4 од 25.11.2015. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Александра Арсенијевића под називом:

"ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНОГ БИЛИЈАРНОГ ХОЛАНГИТИСА КОД МИШЕВА"

На основу одлуке Научно-наставног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан
3. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др мед. Александар Арсенијевић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

Рођен 30.11.1986. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву 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. Школске 2012/13. уписао Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положио је усмени докторски испит са оценом 10 (десет). Две године обављао посао сарадника у настави на предметима: Микробиологија и имунологија, Основи онкологије и Клиничка имунологија. Изабран је у звање асистента за ужу научну област Основи онкологије 2015. године.

Б. Научно истраживачки рад

Кандидат, др мед. Александар Арсенијевић се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. У мају 2013. године учествовао је у мултидисциплинарној школи „5th Course on Cytoskeleton: Cytoskeleton in Cell Organization“ на Институту Кири у Паризу.

Учесник је:

- Републичког пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја:
 1. ОН 175069 „Молекулске детерминанте урођене имуности у аутоимунским болестима и канцерогенези“
- Макро пројеката Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу:
 1. МП 01-14 „Галектин 3, IL-33R и инфекције у имунопатогенези инфламаторних болести“
 2. МП 02-14 „Испитивање цитотоксичног дејства биоактивних супстанци и имуномодулација тумора“

В. Подаци о објављеним радовима

В1. Радови објављени у часописима међународног значаја (Категорија М20)

1. V Zdravkovic ND, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Arsenijevic AN**, Zdravkovic ND, Mitrovic SLj, Arsenijevic NN. Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma. *Int J Med Sci.* 2014;11(9):936-47, **M22 = 5 бодова**

В2. Зборници међународних скупова (Категорија М30)

1. Marija Z. Milovanovic, **A.N. Arsenijevic**, J.Z. Milovanovic, B. Stojanovic, N.N. Arsenijevic, M.L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, August 2013. Abstract book, pp 152, **M34 = 0,5 бодова**
2. Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection facilitates EAE development in resistant BALB/c mice. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p79–80. 2014. **M34 = 0,5 бодова**
3. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Marija Milovanovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p11–12. 2014. **M34 = 0,5 бодова.**
4. Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Jelena Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. IL-33/ST2 axis

- mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoeregulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 75. **M34=0,5 бодова**
5. **Aleksandar Arsenijevic**, Marija Milovanovic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Natasa Zdravkovic, Patrick Leung, Fu-Tong Liu, Erick Gershwin, Miodrag L. Lukic. Deletion of Galectin 3 Enhances Primary Biliary Cirrhosis in Mice by Enhanced Apoptosis of Biliary Epithelial Cells and Release of Autoantigens. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoeregulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book p 43. **M34=0,5 бодова**
 6. Jelena Milovanovic, Marija Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Branka Popovic, Nebojsa Arsenijevic, Stipan Jonjic, Miodrag L. Lukic. CMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoeregulation, Arandjelovac, Serbia, May, 2015. Abstract book p69. **M34=0,5 бодова**
 7. J. Milovanovic, M. Milovanovic, **A. Arsenijevic**, B. Stojanovic, B. Popovic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, M. L. Lukic. MCMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 2015. Abstract book, pp 105. **M34 = 0,5 бодова**

B3. Часописи националног значаја (Категорија M50)

1. **Aleksandar Arsenijevic**, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Eric M. Gershwin, Patrick Leung, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150. **M52 = 1,5 бодова**
2. Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (4): 183-190. **M52 = 1,5 бодова**
3. Zana Besser Silconi, Sasa Benazic, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181-186. **M52 = 1,5 бодова**
4. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Marija Milovanovic, Miodrag L. Lukic. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res. Прихваћен за штампу и биће штампан у једном од наредних бројева часописа. DOI: 10.1515/SJECR-2015-0048, прилог одобрење. **M52 = 1,5 бодова**
5. Sasa Benazic, Zana Besser Silconi, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (4): 10-10. **M52 = 1,5 бодова**

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

"Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева"

Предмет:

Галектин-3 (Gal-3), члан фамилије лектина, присутан је у различитим типовима ћелијама укључујући и ћелије имунског система, модулира како стечени тако и урођени имунски одговор. Овај лектин је укључен у патогенезу многих хроничних инфламацијских и малигних болести. Епителне ћелије нормалних интрахепатичних жучних каналића

конститутивно експримирају низак ниво галектина-3, а експресија се снажно повећава у неким патолошким стањима као што је интрахепатични холангиокарцином. Овај молекул може имати проапоптотску али је много чешће саопштена његова антиапоптотска улога. Повећана експресија Gal-3 у кератиноцитима након излагања UV зрацима штити ове ћелије од апоптозе. Ови налази о функцији Gal-3 могу бити важни за патогенезу примарног билијарног холангитиса (енгл. Primary biliary cholangitis, PBC), коју карактерише имунски одговор на главни митохондријски аутоантиген- PDC-E2. Објављене су обимне студије о узроцима и развоју ове болести, укључујући и оне које истражују различите путеве укључене у имунопатологију болести код мишева и код људи. Подаци из поменутих студија постављају неколико основних принципа. Прво, јасно је документована генска предиспозиција. Друго, изгледа да имунски одговор игра различите улоге зависно од стадијума болести. Треће, иако је болест учесталија код жена то не мора бити последица само присуства полних хормона већ и епигенетских догађаја на X хромозому.

Интересантна је и претпоставка да билијарне епителне ћелије, ВЕС, нису само неми посматрачи развоја PBC, већ да под стимулацијом могу утицати на ток и снагу запаљењског процеса и то како експресијом различитих адхезионих и костимулацијских молекула тако и секрецијом проинфламацијских цитокина (TNF- α , IFN- γ и IL-1). Показано је и да су ове ћелије подложне апоптози, а током овог процеса главни митохондријски антиген, PDC-E2, остаје неизмењен и бива експримиран на луменској површини епителних ћелија жучних каналића. Антиген/и потекли из апоптозома ослобођених из ВЕС могу активирати аутореактивне лимфоците. Такође, апоптотичне ВЕС могу стимулирати макрофаге да синтетишу и секретују проинфламацијске цитокине. Животињски модел болести подразумева имунизацију са 2-октаноичном киселином (2-OA) повезаном са BSA. Овако изазвану благу болест карактерише повећана концентрација антимиохондријских антитела (AMAs) у серуму, портна инфламација и холангитис, што одговара и налазу код људи оболелих од PBC. До данас није истражена улога Gal-3 у патогенези болести а може се претпоставити да би у одсуство овог молекула болест имала тежи ток. Планирано истраживање могло би да понуди одговор каква је улога овог молекула у развоју PBC.

Хипотезе:

Одсуство Gal-3 чини C57BL/6 мишеве осетљивијим на развој експерименталног примарног билијарног холангитиса. Епителне ћелије билијарних каналића Gal-3 *knockout* мишева су осетљивије на апоптозу што подстиче инфламацију и повећава оштећење ткива.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

У току студија објавио је више радова у часописима међународног и националног значаја, од чега један рад као први аутор чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

Релевантна референца:

Aleksandar Arsenijevic, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Eric M. Gershwin, Patrick Leung, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (3): 145-150. **M52 = 1,5 бодова**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Примарни билијарни холангитис је орган-специфична аутоимунска болест коју карактерише мултилинијски хуморални и целуларни имунски одговор на билијарне епителне ћелије и деструкција билијарних каналића. Механизам оштећења билијарних каналића није у потпуности разјашњен, а подаци публикованих студија указују да у том процесу учествују аутореактивни Т лимфоцити. Типична карактеристика болести је присуство анти-митохондријалних антитела у серуму. Имуноски одговор је усмерен на аутоантиген, E2 субјединицу дехидрогеназа комплекса 2-оксо-киселине (енг. *2-oxo-acid dehydrogenase complexes*, 2OADC-E2), а имунодоминантни епитоп овог антигена је E2 субјединица комплекса пируват дехидрогеназе (PDC-E2). Повећан ниво антитела специфичних за PDC-E2 у серуму је удружен са повећањем броја аутоантиген специфичних CD4+ Т и CD8+ Т лимфоцита у јетри.

Вишеструки имунски одговор на имунодоминантни аутоантиген, PDC-E2, указује да је прекид толеранције на PDC-E2 иницијални догађај у развоју примарног билијарног холангитиса. Етиологија болести није позната, али се болест развија код генетски предиспонираних особа изложених факторима околине као што су ксенобиотици и микроорганизми који модификују аутоантиген и тако доприносе прекиду толеранције.

Билијарне епителне ћелије активно учествују у патогенези болести. Експримирају костимулаторне молекуле, CD80 и CD86, и МНС II молекуле и продукују TNF- α , IFN- γ и IL-1 након излагања проинфламацијским цитокинима, па њихова интеракција са Т лимфоцитима може да допринесе оштећењу. Различитом експресијом костимулаторних молекула и проинфламаторних цитокина епителне ћелије билијарних каналића модулишу степен и локализацију инфламаторног процеса.

Епителне ћелије малих билијарних каналића су услед смањене продукције пептида резистентних на протеазе изразито склоне апоптози. Јединствена карактеристика ових ћелија је да PDC-E2 након апоптозе остаје неизмењен и интерреагује са антимитохондријалним антителима. Неоантигени који потичу из апоптотских билијарних епителних ћелија могу да активирају и аутореактивне лимфоците. Код оболелих од примарног билијарног холангитиса се уочава повећана експресија PDC-E2 на апикалној површини билијарних епителних ћелија. Холангиоцити учествују у транспорту IgA до лумена каналића, а IgA специфична за PDC-E2 приликом проласка кроз холангиоците формирају комплексе са антигеном и тако доприносе излагању PDC-E2 на апикалној површини ћелија. Такође, IgA приликом проласка кроз холангиоците активирају каспазе и индукују апоптозу и тако подстичу приказивање аутоантигена на мембрани апоптотских везикула.

Gal-3 је присутан у ћелијама имунског система и различитим епителним ћелијама као што су ћелије слезнице желуца, колоне, простате. Различита инфламаторна стања утичу на повећање експресија Gal-3 у овим ћелијама. Ћелије са повећаном експресијом Gal-3 у цитоплазми су мање осетљиве на апоптозу, а са друге стране делеција гена за Gal-3 повећава осетљивост кератиноцита, ћелија колоректалног карцинома, леукемије, карцинома бубрега, холангиокарцинома на индукцију програмиране ћелијске смрти. Такође, Gal-3 има улогу лиганда који се везује за рецепторе на фагоцитима који препознају апоптотске везикуле па тако подстиче уклањање апоптотичних ћелија. Према томе Gal-3 би могао на најмање два начина да утиче на патогенезу примарног билијарног холангитиса, кроз контролу апоптозе епителних ћелија билијарних каналића које имају централну улогу у ослобађању аутоантигена и кроз контролу уклањања апоптотских везикула које

експримирају интактне аутоантигене. Значајну улогу у презентацији аутоантигена и активацији Т лимфоцита имају дендритске ћелије, а подаци о утицају Gal-3 на функцију дендритских ћелија које су контрадикторни.

За сада у литератури нема података о утицају одсуства/присуства Gal-3 на патогенезу примарног билијарног холангитиса.

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

Главни циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је да се утврди улога Gal-3 у патогенези РВС коришћењем мишева дефицијентних у експресији Gal-3.

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

1. Утврдити утицај недостатка гена за Gal-3 на тежину болести, мерењем параметара РВС
2. Испитати разлике у саставу инфилтрата у јетри мишева са делецијом гена за Gal-3 и мишева који имају функционални ген за Gal-3
3. Испитати утицај Gal-3 на функционални статус дендритских ћелија у инфилтратима јетре мишева имунизованих ксенобиотиком
4. Упоредити серумске цитокинске профиле и доминантан имунски одговор (Th1, Th2 и Th17) лимфоцита који инфилтришу јетру имунизованих Gal-3 дефицијентних и WT мишева
5. Истражити везу између експресије Gal-3, степена апоптозе ВЕС и тежине болести

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Галектин 3 је протеин који може да буде присутан у цитоплазми ћелија у мировању, једру ћелија које се деле, а секретује се и у екстрацелуларни простор. Gal-3 има важну улогу у контроли различитих биолошких функција, укључен је у обраду mRNA, регулише ћелијски циклус и има дуалну улогу у модулацији ћелијске адхезије и имунских/инфламацијских процеса. Gal-3 је присутан у епителним ћелијама у којима има антиапоптотски ефекат. Антиапоптотске ефекте остварује супресијом ERK активације и стимулацијом активности АКТ сигналног пута. Експресија Gal-3 у епителним ћелијама се повећава по излагању штетним агенсима. Новије студије указују на све истакнутију улогу Gal-3 у патогенези хроничних инфламаторних болести. Значајно је истаћи да Gal-3 има и про- и анти- инфламацијске ефекте у зависности од околности инфламације и циљног ткива или ћелије. Апоптоза епителних ћелија билијарних каналића игра значајну улогу у развоју примарног билијарног холангитиса. Како Gal-3 у епителним ћелијама регулише процес апоптозе вероватно је да Gal-3 учествује и у имунопатогенетским механизмима примарног билијарног холангитиса. Према доступним подацима из литературе улога Gal-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса до сада још увек није испитана.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње. Истраживање ће се обавити на мишицама соја C57BL/6 (*wild type*, WT) и Gal-3^{-/-} дефицијентним мишицама на C57BL/6 подлози, старим 8 недеља. 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 рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Индуковање РВС, дијагноза и праћење тока болести.

Примарни билијарни холангитис ћемо изазвати као што је раније описано (16). Узорци серума ће се прикупљати друге, четврте и 8. недеље после иницијалне имунизације са 20А-BSA. У серумима ће се одређивати концентрација антитела на PDC-E2, коришћењем ELISA технике (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) како је то раније описано (16). Исечци узорака ткива, добијени након жртвовања животиња, ће се након стандардног третмана бојити хематоксилином и еозином (H&E) и у њима микроскопском анализом регистровати перипортна инфламација, инфилтрација билијарних каналића са и без оштећења као и субкапсуларни инфилтрати. Свака од поментих патолошких промена ће бити оцењиване са: 0 = неизмењено; 1 = благе; 2 = умерене; 3 = изражене и 4 = врло изражене. Хистолошки индекс I биће израчунаван као средња вредност свих оцењених промена. Поред тога оцењиваће се и присуство гранулома и фиброзе и то: 0 = нема; 1 = благе; 2 = умерене; 3 = изражене, а хистолошки индекс II ће бити израчунаван на основу тих вредности.

Исечци ће се бојити још и Сиријус црвеном бојом и то тако што ће се након рехидрације третирати 0.1% раствором боје *Sirius Red F3BA* у засићеној пикринској киселини (*Sigma-Aldrich, St. Louis*), у трајању од једног сата. Потом ће се исечци два пута потапати у закишељену воду и три пута у 100% етанол, да би најзад били опрани ксилолом. Процена степена фиброзе у исечцима мишјих јетри, обојених на овај начин, обавиће се коришћењем програма *ImageJ* (*National Institute of Health, Bethesda, MD*) на 10 видних поља по исечку.

Мерење цитокина. Концентрације цитокина ће се мерити употребом мишјег сета за IL-17, IL-13, and IFN- γ (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) према упутствима произвођача.

Имунохистохемијске анализе. Депарафинисани исечци ће се инкубирати са зечјим моноклонским антителима за мишји цитокератин-7 (CK-7) и Gal-3. Везана антитела се визуализују помоћу конјугата специфичног за зечја антитела (*Expose Rb-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) и фотомикрографисањем помоћу дигиталне камере повезане са светлосним микроскопом (*Olympus BX51*).

Изоловање инфилтришућих мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија. Ћелије ће бити издвојене из ткива јетре као што је то раније описано (2). Мононуклеарне ћелије ће бити регистроване помоћу моноклонских антитела (обележених флуоресцентним бојама) и то за: CD4, CD8 α , TCR β , F4/80, CD11c, CD19, I-A/I-E, CD86, IL-12, TNF α , IL-17, IFN- γ (*BD Biosciences*). За интрацелуларна бојења, ћелије ће претходно бити активисане PMA/јономицином. Обележене ћелије ће бити анализиране помоћу FACSCalibur проточног цитометра (*BD Biosciences*) а анализа обављена коришћењем програма *FlowJo* (*Tree Star*).

Изоловање VECs и детектовање апоптозе. За изоловање ових ћелија користиће се перфузија јетре у два корака. Након перфузије хепатоцити ће бити селективно уклоњени благим протискавањем кроз инцизију начињену на јетриној капсули. Преостале ћелије ће бити суспендоване у обогаћеном DMEM медијуму. Након десетодневне култивације овако изолованих ћелија оне ће бити изложене јономицину (1 $\mu\text{g/ml}$) у трајању од 22 сата. Процент апоптотичних ћелија ће бити одређен проточном цитометријом уз помоћ *Annexin V FITC Detection Kit* (*BD Pharmingen, San Jose, CA*).

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима хистолошког скорa и

серумске концентрације IL-6, IFN- γ , IL-13 и IL-17 и процента дендритских ћелија изолованих из јетре добијених у прелиминарном експерименту. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), 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 (за проценат дендритских ћелија у јетри), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 43 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's t* тест за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 18.

Статистичка обрада података

Добијени резултати ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне девијације (или стандардне грешке). Статистичка значајност ће се одређивати *Student*-овим t тестом, а по потреби и *Mann-Whitney*-евим U test. Статистичка значајност ће бити претпостављена за $p=0.05$. Све статистичке анализе ће бити обављене употребом програма SPSS 18.0.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да делеција гена за Gal-3, у експерименталном мишијем моделу PBC, интензивира болест, да појача портну инфламацију и фиброзу. Познато је да су епителне ћелије без Gal-3^{-/-} знатно подложније апоптози па се очекује израженија апоптоза билијарних епителних ћелија Gal-3^{-/-} мишева након имунизације ксенобиотиком који стимулише имунски посредовано оштећење ових ћелија. Интензивнију апоптозу билијарних епителних ћелија прати интензивније ослобађање аутоантигена што резултира појачаном стимулацијом ћелија које презентују антиген и последичном интензивнијом активацијом аутореактивних лимфоцита и интензивирањем аутоимунског процеса. Овим испитивањем би истражили нове имунопатогенетске механизме примарног билијарног холангитиса и евентуално указали на нове терапијске мере у лечењу почетних фаза примарног билијарног холангитиса.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Користећи Gal-3 дефицијентне мишеве, испитивањем клиничке слике, хистолошком анализом препарата јетре, детекцијом анти-PDC-E2 антитела (IgG, IgM и IgA), одређивањем нивоа цитокина у серуму ELISA методом, имунохистохемијским анализама ткива јетре и специјалним бојењима ткива којима се детектује фиброза, испитаће се утицај Gal-3 на развој експерименталне примарног билијарног холангитиса. Методом проточне цитометрије ће се анализирати утицај Gal-3 на састав инфилтрата јетре, фенотип и цитокински профил мононуклеарних ћелија које инфилтришу јетру. Испитаће се утицај овог молекула на функционални статус дендритских ћелија присутних у јетри пре и после индукције болести. Утврдиће се утицај индукције болести на експресију Gal-3 у епителним ћелијама билијарних каналића и утицај експресије Gal-3 на апоптозу епителних ћелија билијарних каналића.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже доц. др Марију Миловановић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан
3. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Закључак и предлог Комисије

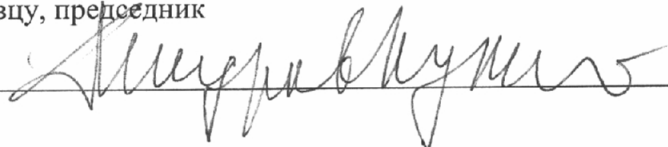
Др мед. Александар Арсенијевић, сарадник у настави у звању асистента на предмету Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, на основу досадашње стручне, научне и педагошке активности испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука и законом о универзитету 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 Научно-наставном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Александра Арсенијевића, под називом **"Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева"** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

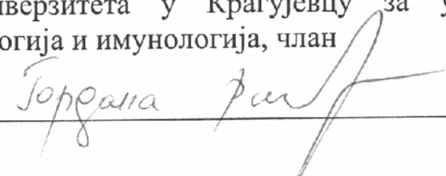
1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник



2. Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан



3. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан



У Крагујевцу, 21.12.2015. године

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ
Број: 01-1414/2-11
Датум: 24. 02. 2016. године
К р а г у ј е в а ц

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу одржаној дана 24. 02. 2016. године донета је

О Д Л У К А

Усваја се Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под називом:

ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНОГ БИЛИЈАРНОГ ХОЛАНГИТИСА КОД МИШЕВА

кандидата Александра Арсенијевића, у саставу:

1. проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан
3. доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.



ПРЕДСЕДАЈУЋИ ВЕЋА

проф. др Предраг Чановић, декан

Достављено:

- Кандидату
- Универзитету у Крагујевцу
- Архиви

Број	05	1912/4	02.03.16	ГОДИНЕ
Датум				
Место				
Почео				
Завршио				

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
Веће за медицинске науке
Број: IV-03-103/8
Датум: 01.03.2016. год.
КРАГУЈЕВАЦ

Веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу на основу члана 109., а у вези са чланом 46. став 6. Статута Универзитета у Крагујевцу (број П-01-95 од 30.03.2015. године - пречишћен текст) и Одлуке о изменама и допунама Статута Универзитета у Крагујевцу (број П-01-993/11 од 28.12.2015. године), члана 4. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и члана 42. и 43. став 1. Пословника о раду стручних већа, (број 103/12 од 27.01.2010. године), на седници одржаној 01.03.2016. године, донело је следећу

ОДЛУКУ

I Дата је сагласност на Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под насловом „Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева“, кандидата Александра Арсенијевића, који је усвојило Наставно-научно веће Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Одлуком број 01-1414/2-11 од 24.02.2016. године.

II Предложена тема је у оквиру матичности факултета и у складу са потребама развоја науке и приоритетима научног и технолошког развоја.

Образложење

Правни основ за доношење ове Одлуке садржан је у члану 109. Статута Универзитета у Крагујевцу (број П-01-95 од 30.03.2015. године - пречишћен текст) и Одлуке о изменама и допунама Статута Универзитета у Крагујевцу (број П-01-993/11 од 28.12.2015. године) који уређује надлежност већа, а у вези је са чланом 46. став 6. Статута Универзитета који уређује надлежност Универзитета за давање сагласности на предложену тему за израду докторске дисертације, члану 4. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације који уређује надлежност Универзитета за давање сагласности на Извештај комисије за оцену подобности теме, као и одређивање ментора и члану 42. и 43. став 4. Пословника о раду стручних већа Универзитета у Крагујевцу, број 103/12 од 27.01.2010. године, који уређују врсте аката која доносе већа.

Веће за медицинске науке разматрало је Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под насловом „Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева“, кандидата Александра Арсенијевића, број 05-458 од 20.01.2016. године, и Одлуку Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу о усвајању наведеног Извештаја број 01-1414/2-11 од 24.02.2016. године, и донело Одлуку као у диспозитиву.

ПРЕДСЕДНИК

Већа за медицинске науке,



Проф. др Јасмина Кнежеввић

ДОСТАВИТИ:

- факултету;
- кандидату;
- архиви.

**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ**

Број: 01-2873/3-21

Датум: 06. 04. 2016. године

К р а г у ј е в а ц

II/2

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу одржаној дана 06. 04. 2016. године донета је

О Д Л У К А

Доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, именује се за ментора за израду докторске дисертације под називом: Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева, кандидата Александра Арсенијевића.



ПРЕДСЕДАЈУЋИ ВЕЋА

проф. др Предраг Чановић, декан

Достављено:

-Кандидату

-Универзитету у Крагујевцу

-Архиви

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Веће за медицинске науке

Број: IV-03-268/23

Датум: 13.04.2016. год.

КРАГУЈЕВАЦ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
19.04.16.

Организац.	19.04.16.		
05	4164/14		

Веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, на основу члана 108., а у вези са чланом 46. став 5. Статута Универзитета у Крагујевцу (број II-01-148 од 26.02.2016. године – пречишћен текст), члана 4. став 6. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и Правилника о изменама и допунама Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације (број III-01-251/20 од 31.03.2016. године) и чланова 42. и 43. став 1. Пословника о раду стручних већа Универзитета у Крагујевцу (број 103/12 од 27.01.2010. године), на седници одржаној 13.04.2016. године, донело је следећу

ОДЛУКУ

I Даје се сагласност на Одлуку Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, број 01-2873/3-21 од 06.04.2016. године.

II **Др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија и имунологија, **именује се за ментора** за израду докторске дисертације под називом „Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева“ кандидата **Александра Арсенијевића**.

Образложење

Правни основ за доношење ове Одлуке садржан је у члану 108. Статута Универзитета у Крагујевцу који уређује надлежност већа, а у вези је са чланом 46. став 5. Статута Универзитета који уређује да Веће Факултета одређује кандидату ментора из реда наставника универзитета, члану 4. став 6. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације који уређује да када веће факултета, прихвати извештај комисије, одобрава рад на изради докторске дисертације и одређује кандидату ментора из реда наставника универзитета. и члановима 42. и 43. став 1. Пословника о раду стручних већа Универзитета у Крагујевцу, који уређују врсте аката која доносе стручна већа.

Веће за медицинске науке разматрало је Одлуку Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, број 01-2873/3-21 од 06.04.2016. године, којом је др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија и имунологија, именована за ментора за израду докторске дисертације под називом „Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева“ кандидата Александра Арсенијевића, и донело Одлуку као у диспозитиву.

ПРЕДСЕДНИК

Већа за медицинске науке,



Проф. др Јасмина Кнежевић

ДОСТАВИТИ:

- факултету;
- ментору;
- кандидату;
- архиви.