

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На I редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.10.2023. године, на основу молбе ментора, др Љиљане Николић, вишег научног сарадника Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Институт од националног значаја за Републику Србију, и др Милене Милошевић, доцента Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Катарине Д. Милићевић, истраживача сарадника Универзитета у Београду – Биолошког факултета, под насловом: „**Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система**”, у следећем саставу: др Павле Анђус, редовни професор у пензији Универзитета у Београду – Биолошког факултета, др Јелена Богдановић Пристов, научни саветник Универзитета у Београду – Института за мултидисциплинарна истраживања, др Ивана Бјелобаба, научни саветник Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, др Данијела Батављевић, виши научни сарадник Универзитета у Београду – Биолошког факултета и др Марија Ацић Буквић, научни сарадник Универзитета у Београду – Биолошког факултета.

Комисија је прегледала докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Катарине Д. Милићевић под насловом „**Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система**“ урађена је у Центру за ласерску микроскопију – Института за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“.

Докторска дисертација садржи 91 страну. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (20 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (14 страна), Резултати (23 стране), Дискусија (8 страна), Закључци (1 страна), Литература (24 стране, 433 библиографске јединице). Дисертација садржи 26 слика (8 слика у поглављу Увод и 18 слика у поглављу Резултати) и 6 табела у поглављу Материјал и методе. Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) елементе са неопходним информацијама о докторској дисертацији: Насловну страницу на српском језику, Насловну страницу на енглеском језику, Страницу са информацијама о менторима, члановима комисије и датумом одбране, Страницу са информацијама о финансирању и изјавама захвалности, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику, Листу скраћеница и Садржај. На крају докторске дисертације се налазе Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Увод докторске дисертације кандидаткиње је подељен у пет целина у којима је дат преглед досадашњих сазнања из литературе која се тичу проблематике докторске дисертације. У оквиру прве целине дат је преглед морфолошких и физиолошких својстава астроцита и микроглије. Посебно је описан значај калцијумске сигнализације и глиотрансмисије астроцита. У другој целини је дат преглед морфолошких и физиолошких својстава микроглије, док је у трећој целини дат преглед особина и компоненти имунског система. У четвртој целини је дат детаљан опис неуроинфламације и улоге астроцита и микроглије у овом процесу, међу којима је посебно истакнута астроглијална пуринаргичка сигнализација у неуроинфламацији. Кандидаткиња је у оквиру пете целине дала преглед патофизиолошких процеса који карактеришу две болести нервног система које су изучаване у оквиру ове докторске тезе: мултиплу склерозу (МС) и амиотрофичну латерлану склерозу (АЛС) уз истицање терапијских присутпа који се примењују за ове две болести. Описане су до сада дефинисане патофизиолошке промене астроцита и микроглије карактеристичне за ове две болести централног нервног система (ЦНС). Дат је преглед литературе о интеракцији астроцита и микроглије са имунским факторима и њиховом значају у ове две болести које су праћене неуроинфламацијом.

У следећем поглављу **Циљеви истраживања**, концизно је дефинисано 5 научних циљева како би се испитала интеракција астроцита и микроглије са компонентама имунског система које су укључене у неуроинфламацијске процесе у МС и АЛС:

1. Испитати Ca^{2+} одговор контролних астроцита на присуство аутореактивних имунских ћелија (CNS-ИЋ) инфилтрираних у кичмену мождину пацова са симптомима експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ).

2. Испитати допринос астроглијалних $\alpha\text{v}\beta_3$ -интегрина, конексин-43 (Cx-43) хемиканала, пуринаргичког P2X7 рецептора (P2X7R) и митохондрија ћелија-ћелија интеракцији контролних астроцита и CNS-ИЋ.

3. Истражити ћелија-ћелија интеракцију астроцита и инфилтрираних имунских ћелија *in vivo*, у ЦНС ткиву пацова са ЕАЕ симптомима кроз испитивање експресије и дистрибуције астроглијалног пуринаргичког P2X7R и Cx-43 у кичменој моздини пацова са симптомима ЕАЕ.

4. Испитати Ca^{2+} одговор hSOD1^{G93A} астроцита након излагања имуноглобулину G (IgG) из серума АЛС пацијената.

5. Испитати Ca^{2+} одговор контролне микроглије након излагања IgG из серума АЛС пацијената.

У поглављу под називом **Материјал и методе** кандидаткиња је детаљно описала све протоколе и истраживачке методе као и материјале коришћене у изради експеримената у оквиру ове докторске дисертације. У првом делу овог поглавља дат је табеларни приказ свих коришћених хемикалија, раствора, пуфера, медијума, примарних и секундарних антитела. Затим су детаљно описани експериментални пацовски модели: hSOD1^{G93A} модел АЛС и експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ) модел МС. У случају hSOD1^{G93A} модела описани су протоколи за утврђивања присуства трансгена у потомству применом PCR, а затим је описана појава и прогресија симптома АЛС. У случају ЕАЕ модела описан је протокол за индуковање ЕАЕ, описани су симптоми и прогресија ЕАЕ и дефинисане су временске тачке у којима су изоловани узорци ткива за даље експерименте. Кандидаткиња је затим описала протоколе изолације имунских ћелија из кичмених моздина ЕАЕ животиња које су потом коришћене у циљу испитивања ћелија-ћелија интеракције са астроцитима у култури. Описан је протокол за изолацију IgG из серума АЛС пацијената који су коришћени у експериментима калцијумског осликовања астроцита и микроглије у култури. Детаљно су приказани протоколи припреме примарних култура астроцита и микроглије. Потом је дат детаљан протокол калцијумског осликовања астроцита и микроглије у култури применом микроскопског система и описан је приступ у анализи различитих

параметара регистрованог калцијумског одговора. Концентрација ослобођеног АТП из имунских ћелија и ћелија у култури је одређена применом биолуминисцентног АТП есеја. Детаљно је описан протокол имунофлуоресцентног обележавања ткивних пресека, као и параметри снимања микрографија коришћењем конфокалног микроскопа и описан је начин квантитативне анализе добијених микрографија и примене одговарајућих програма. Кандидаткиња је детаљно описала протоколе за ко-имунопреципитацију, имуноблот као и за изолацију протеина из ткива и ћелијске културе, као и примењене анализе.

У оквиру поглавља **Резултати**, кандидаткиња је у оквиру три тематске целине систематично и концизно представила резултате своје докторске дисертације. Резултати су поткрепљени одговарајућим композитним сликама које садрже јасно обележене репрезентативне конфокалне микрографије, имуноблотове, примере записа калцијумских одговора и графичке приказе одговарајућих квантитативних анализа. У првој целини су приказани резултати који показују да CNS-ИЋ утичу на хомеостазу јона Ca^{2+} у астроцитима у култури. Применом *in vitro* експерименталног система у ком су астроцити обележени Fluo-4 АМ калцијумским индикатором је показано да након сусрета астроцита са CNS-ИЋ изолованим из кичмене мождине пацова са симптомима ЕАЕ долази до пораста унутарћелијског Ca^{2+} у астроцитима. Ове промене у Ca^{2+} одговору нису уочене након апликације периферних имунских ћелија изолованих из цервикалних лимфних чворова ЕАЕ пацова. Употребом различитих фармаколошких блокатора је испитано који мембрански протеини посредују у овом астроглијалном одговору и искључени су путеви посредовани метаботропним глутаматним рецепторима као и TRPA1 канали. Блокирање пуринергичких рецептора је довело до смањења Ca^{2+} одговора, а специфична блокада P2X7R је у великој мери обуставила овај одговор, указујући да овај рецептор посредује у Ca^{2+} одговору астроцита у култури након контакта са CNS-ИЋ. Показано је да је АТП који активира P2X7R ослобођен из астроцита кроз хемиканале, јер је блокада хемиканала довела до смањења Ca^{2+} одговора астроцита при апликацији CNS-ИЋ. Апликација $CD4^+$ ћелија изолованих из CNS-ИЋ на астроците, изазвала је Ca^{2+} одговор астроцита сличан одговору које су изазвале укупне CNS-ИЋ. Имунофлуоресцентно обележавање маркера астроцита (GFAP) и $CD4^+$ Т ћелија у кичменој мождини ЕАЕ пацова је показало да значајан број инфилтрираних $CD4^+$ ћелија интерагује са астроцитима и тиме додатно указало на значај директног контакта између астроцита и имунских ћелија у ЕАЕ.

У другој целини резултата приказана су открића о спреси P2X7R, β_3 -интегрин и Cx-43 у међућелијској интеракцији астроцита са ауторективним имунским ћелијама. Применом имуноблот методе је показано смањене експресије P2X7R у лумбалном региону кичмене мождине пацова оба пола са симптомима ЕАЕ у односу на контролу, док је протеинска експресија Cx-43 непоремњена што је додатно потврђено одређивањем интензитета сигнала флуоресцентно обележених P2X7R и Cx-43. Највећа заступљеност ова два протеина је уочена у непосредној близини инфилтрираних $CD4^+$ Т ћелија у кичменој мождини ЕАЕ пацова. Слично, колокализација флуоресцентно обележених P2X7R и Cx-43 је најизраженија у непосредној близини инфилтрираних $CD4^+$ Т ћелија иако је њена вредност смањена у лумбалном региону кичмене мождине ЕАЕ пацова. Методом ко-имунопреципитације је показана интеракција P2X7R и Cx-43 у ткиву кичмене мождине. Кандидаткиња је коришћењем претходно описаног *in vitro* система показала активну улогу астроглијалних митохондрија у обликовању астроглијалног Ca^{2+} одговора након сусрета са CNS-ИЋ. Блокирање Na^+/Ca^{2+} и H^+/Ca^{2+} измењивача на митохондријалној мембрани је довело до повећаног ослобађања АТП из астроцита и продуженог трајања Ca^{2+} одговора на CNS-ИЋ и АТП у односу на контролне услове. Блокада $\alpha_v\beta_3$ -интегрин специфичним антителом је довела до смањења Ca^{2+} одговора у астроцитима након излагања CNS-ИЋ и установљено је да овај интегрин учествује у интеракцији астроцита са CNS-ИЋ. Ко-имунопреципитацијом је показана интеракција β_3 -интегрин и P2X7R, а имуноблот методом је показана повећана експресија овог интегрин у лумбалном региону кичмене мождине ЕАЕ пацова.

У трећој целини резултата, кандидаткиња је испитала како Ca^{2+} одговор астроцита и микроглије након излагања имунским факторима у АЛС. Најпре је имунофлуоресцентним обележавањем показано одсуство инфилтрираних CD4^+ Т ћелија у кичменој мождини hSOD1^{G93A} пацова. Применом *in vitro* експерименталног система у ком су астроцити обележени Fluo-4 AM, испитан је Ca^{2+} одговор hSOD1^{G93A} и контролних астроцита након апликације IgG пореклом из серума АЛС пацијената. Установљено је да је Ca^{2+} одговор hSOD1^{G93A} астроцита повећан као последица оштећеног механизма регулације унутарћелијског Ca^{2+} . Ефекат IgG пореклом из серума здравих особа и оболелих од АЛС није уочен на Ca^{2+} одговор микроглије у култури.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња је дала критички осврт на резултате докторске дисертације у контексту литературних података. Кандидаткиња је систематично обрадила и дискутовала све добијене резултате у контексту познатих литературних података у вези са МС и АЛС. Кандидаткиња је указала на допринос описаних промена у глијским ћелијама актуелним научним сазнањима о неуродегенеративним процесима у МС и АЛС и истакла значај интеракције астроцита са имунским факторима.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња је изнела концизне закључке произашле из анализе резултата докторске дисертације:

1. Астроцити у контакту са инфилтрираним имунским ћелијама реагују брзим и пролазним калцијумским одговором који је посредован аденозин-3-фосфатом ослобођеним кроз хемиканале и последичном активацијом пуриног P2X7R.

2. У кичменој мождини ЕАЕ и контролних пацова P2X7R гради комплексе са Cx-43. Експресија P2X7R је смањена у кичменој мождини ЕАЕ пацова, али је његова дистрибуција таква да колокализује са Cx-43 у непосредној близини инфилтрираних CD4^+ Т ћелија.

3. Директан контакт између астроцита и аутореактивних имунских ћелија је посредован астроглијалним $\alpha_v\beta_3$ -интегрином. P2X7R формира комплексе са β_3 -интегрином у кичменој мождини контролних и ЕАЕ пацова, а експресија β_3 -интегрин је повећана у ЕАЕ.

4. Митохондрије, као унутарћелијски депо калцијума, учествују у обустављању астроглијалног калцијумског одговора по контакту са аутореактивним имунским ћелијама.

5. hSOD1^{G93A} астроцити показују измењен калцијумски одговор на IgG изоловане из серума АЛС пацијената услед поремећене способности складиштења унутарћелијског јона калцијума.

6. Ћелије микроглије не показују калцијумски одговор на IgG изоловане из серума АЛС пацијената, указујући на другачији образац активације овог глијалног ћелијског типа.

На основу добијених резултата и изведених појединачних закључака кандидаткиња је извела и један општи закључак да присуство имунских фактора у непосредној близини астроцита изазива њихов калцијумски одговор у ЕАЕ и АЛС моделима. Ова докторска дисертација продубљује знања о интеракцији астроцита са имунским факторима, аутореактивним имунским ћелијама изолованим из кичмене мождине ЕАЕ пацова и имуноглобулинима G из серума АЛС пацијената. Открића ове тезе се могу применити за развој нових терапеутских приступа у лечењу неуроинфламаторних болести ЦНС са фокусом на директну интеракцију астроцита са имунским факторима.

У поглављу **Литература** кандидаткиња је приказала 433 библиографске јединица које су на адекватан начин цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. радови у часописима међународног значаја

1. Bijelić, D., Milićević, K., Lazarević, M., Miljković, D., Bogdanović Pristov, J., Savić, D., Petković, B., Andjus, P., Momčilović, M., Nikolić, L. (2020) Central nervous system-infiltrated immune cells, induce calcium increase in astrocytes via astroglial purinergic signaling. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.24699>
M21 (58/272 Neurosciences)
IF(2019) **4,699**
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32799373/>
2. Milićević, K., Korenić, A., Milošević, M., Andjus, P. (2022). Primary Cultures of Rat Astrocytes and Microglia and Their Use in the Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. <https://doi.org/10.3791/63483>
M23 (52/74 Multidisciplinary Sciences)
IF(2021) **1,424**
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35815991/>
3. Milicevic, K., Bataveljic, D., Bogdanovic Pristov, J., Andjus, P., Nikolic, L. (2023). Astroglial Cell-to-Cell Interaction with Autoreactive Immune Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Involves P2X7 Receptor, β 3-Integrin, and Connexin-43. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells12131786>
M21 (51/195 Cell Biology)
IF(2021) **7,666**
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37443820/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Milićević, K., Bataveljić, D., Bogdanović Pristov, J., Andjus, P., Nikolić, Lj. P2X7R persists on astrocytes on the border surface with adjacent autoreactive immune cells. *SINAPSA Neuroscience Conference '23 (SNC'23)*, September 28 – 30, 2023, Ljubljana, Slovenija. *Book Of Abstracts* p. 43. **M34**
2. Milićević, K., Bataveljić, D., Bogdanović Pristov, J., Andjus, P., Nikolić, L. P2X7R, β 3-integrin and Cx-43 mediate interaction between astrocytes and adjacent autoreactive immune cells. *XVI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease*, July 8-11, 2023, Berlin, Germany. *Abstract book, Glia, Volume 71*, pp. E941-E942. **M34**
3. Milicevic, K., Bataveljic, D., Bogdanovic Pristov, J., Andjus, P., Nikolic, L., $\alpha\beta$ 3-Integrin and mitochondria mediate astrocyte response to autoreactive immune cells. *8th congress of Serbian Neuroscience Society with international participation*, 31 May–2 June, 2023, Belgrade, Serbia. *Book of Abstracts*, p. 101. **M34**
4. Milićević, K., Lazarević, M., Momčilović, M., Todorović, N., Petković, B., Stojadinović, G., Nikolić, L. Naïve astrocytes react to CNS-infiltrated immune cells. *16th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, September 26-30, 2022, Belgrade, Serbia. *Physical Chemistry 2022, Vol. 1*: pp. 267-270. **M33**

5. Milićević, K., Bijelić, D., Lazarević, M., Miljković, Đ., Bogdanović Pristov, J., Petković, B., Andjus, P., Nikolić, L. (2020). Central nervous system-infiltrated immune cells alter calcium dynamics in astrocytes. 3rd Symposium on Physiology and pathology of neuroglia; November 24-25, 2020, Virtual, Querétaro, México: Instituto de neurobiología. Book of Abstract, p. 45. **M34**
6. Nikolic, L., Bijelic, D., Milicevic, K., Momcilovic, M., Bogdanović Pristov, J., Petkovic, B., Andjus, P., Miljkovic, D. (2019). Astrocyte activity in the central nervous system autoimmunity. Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting, July 10 – 13, 2019, Belgrade, Serbia. Book of Abstract, p. 295. **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Катарине Д. Милићевић, Б3001/2017 послата је дана 6.11.2023.године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности је достављен менторима 7.11.2023.године.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација (у даљем тексту Правилник) чија се одбрана организује на Универзитету у Београду и налаза у Извештају из програма iThenticate (у даљем тексту Извештај) којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система**”, аутора Катарине Д. Милићевић, констатујемо да утврђено подударање текста износи 12%. Увидом у Извештај и детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, утврђено је да је подударање са четири извора било 1% и у свим преосталим случајевима мање од 1%. Овај степен подударности је последица присутних термина у претходно публикованим резултатима из исте области истраживања, и то пре свега у опште прихваћеним фразама, затим подударање цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв.општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Катарине Д. Милићевић, под насловом „**Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система**“, те се прописани поступак припреме за одбрану њене докторске дисертације може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Катарине Д. Милићевић под насловом „Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система“ представља оригинални научни допринос у разумевању интеракције глијалних ћелија, астроцита и микроглије, са имунским факторима у неуроинфламацијским процесима који прате МС и АЛС. Најзначајнији резултат ове докторске тезе показује да је калцијумски одговор у астроцитима изазван присуством имунских фактора у њиховој непосредној близини. Применом различитих метода кандидаткиња Катарина Д. Милићевић је испитала молекулске механизме у основи ове ћелија-ћелија интеракције и утврдила да њихову окосницу чини заједничко деловање пуринергичких рецептора, конексина и интегрина. Резултати ове докторске дисертације пружају нови поглед на разумевање неуроинфламацијских процеса у МС и АЛС и могу се применити за развој нових терапеутских приступа у чијој је основи директна интеракција астроцита са имунским факторима. Квалитет ове дисертације је потврђен у три научне публикације у часописима са SCI листе.

На основу изложених чињеница које указују на квалитет и научни допринос постигнутих резултата докторске дисертације Катарине Д. Милићевић под насловом „Утицај имунских фактора на одговор астроцита и микроглије у инфламацијским процесима централног нервног система“, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета да прихвати овај извештај и предложи јавну одбрану ове докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 8. 11. 2023.године

др Павле Анђус, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Јелена Богдановић Пристов, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за
мултидисциплинарна истраживања

др Ивана Бјелобаба, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“, Институт од
националног значаја за Републику Србију

др Данијела Батављевић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Марија Аџић Буквић, научни сарадник
Универзитет у Београду - Биолошки факултет