

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На 6. редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. 04. 2018. године прихваћен је извештај ментора др Гордане Тимотијевић и др Светлане Радовић о урађеној докторској дисертацији Бојана Јевтића, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић” под насловом „**Утицај различитих екстраката краставца (*Cucumis sativus* L. cv. *Chinese long*) на енцефалитогени потенцијал Т лимфоцита пацова у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**” и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. Др Гордана Тимотијевић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор
2. Др Светлана Радовић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
3. Др Ђорђе Миљковић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Бојана Јевтића, под насловом „**Утицај различитих екстраката краставца (*Cucumis sativus* L. cv. *Chinese long*) на енцефалитогени потенцијал Т лимфоцита пацова у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**” обухвата 139 страница текста, 33 слике и 3 табеле. Текст се састоји од 7 поглавља и то: Увод (20 страна), Циљеви рада (2 стране), Материјал и методе (28 страна), Резултати (42 стране), Дискусија (14 страна), Закључци (2 стране) и Литература (31 страна).

Предмет докторске дисертације је био да се испита утицај екстраката краставца и њихових биолошки активних једињења на енцефалитогене ћелије, као и њихов терапеутски ефекат у превенцији и третману аутоимуности ЦНС.

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у Лабораторији за молекуларну биологију биљака Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство и у Одељењу за имунологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитета у Београду, а процедуре које су укључивале рад са животињама су одобрене од стране Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (решење бр. 2-10/15).

Резултати истраживања које је кандидат Бојан Јевтић приказао у овој дисертацији пружају нова сазнања о потенцијалима екстраката краставца и њихових активних супстанци у ограничавању аутоимунског одговора усмереног против централног нервног система

(ЦНС). С обзиром на то да је мултипла склероза хронична болест за коју за сада не постоји терапија која доводи до излечења, научно и социолошки је оправдана потрага за новим терапијским модалитетима. Имајући у виду да су ћелијске популације које су покретачи патогенезе мултипле склерозе, као и ефекторске ћелије које доводе до уништавања ткива ЦНС, принципијелно исте и код великог броја других аутоимунских и хроничних инфламаторних болести, екстракти краставца и њихове активне супстанце могу бити коришћене и у терапији тих болести. Такође, отвара се и могућност да се испитивани екстракти и кукурбитацини користе и за суплементацију постојећих лекова у циљу остварења бољег терапеутског ефекта. Коначно ова студија има и базични значај јер показује како кукурбитацин Б и Е делују на имунски систем, како на ћелијском тако и на молекуларском нивоу.

Анализа докторске дисертације:

Увод се састоји од 7 поглавља у којима је јасно представљена савремена слика неуроимунолошке области у којој је дисертација урађена. У првом поглављу је детаљно приказана мултипла склероза, пре свега аспекти њене етиологије и ризика који воде њеном настанку. У другом поглављу је приказан ЕАЕ (експериментални аутоимунски енцефаломијелитис) као модел који је изузетно битан за разумевање патогенезе мултипле склерозе, као и за испитивање терапијског потенцијала различитих агенаса. У следећим поглављима је објашњено савремено виђење патогенезе мултипле склерозе и ЕАЕ, а потом и терапијски приступи засновани на модулатији аутоимунског одговора усмереног против ЦНС. Затим су приказане могућности једињења биљака у модулатији имунског одговора, са акцентом на њихова имуносупресивна и имунорегулацијска дејства. Коначно, последња два поглавља су посвећена имуномодулацијским особинама биолошки активних једињења краставца, а међу њима посебно кукурбитацинима.

У оквиру поглавља **Циљеви** истраживања кандидат полази од тога да биљке представљају богат извор најразличитијих једињења која могу послужити за развој нових лекова и третман разних болести. На основу досадашњих података о антиинфламацијском, антиоксидацијском и антидијабетогеном дејству краставца, биљке широко распрострањене у исхрани људи, постављен је основни циљ овог истраживања а то је да се испитају имуномодулацијска дејства различитих екстраката краставца на основне енцефалитогене ћелије (Т лимфоците и макрофаге) укључене у патогенезу ЕАЕ.

Имајући у виду основни циљ, успостављени су следећи специфични циљеви:

1. Припремање екстраката различитих органа краставца (корен, лист, стабло) различитим методама екстракције.
2. Испитивање имуномодулацијског ефекта припремљених екстраката на ћелије дренажујућих лимфних чворова и CD4⁺ лимфоците у моделу ЕАЕ *in vitro*.
3. Одабир екстракта са најпотентнијим антиенцефалитогеним ефектом и фитохемијска анализа екстракта методом масене спектрометрије.
4. Испитивање имуномодулацијског ефекта одабраног екстракта на CD4⁺ Т лимфоците, макрофаге и дендритске ћелије у моделу ЕАЕ *in vitro*.
5. Испитивање имуномодулацијског ефекта једињења КукБ и КукЕ на CD4⁺ Т лимфоците и макрофаге у моделу ЕАЕ *in vitro*.
6. Утврђивање ћелијских и молекуларских механизма деловања екстракта *ex vivo* у моделу ЕАЕ.
7. Третман ЕАЕ са одабраним екстрактом у *in vivo* условима и праћење клиничког тока болести.
8. Испитивање цитотоксичности одабраног екстракта и једињења КукБ и КукЕ у

моделу рибе зебрице *in vivo*.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описане коришћене методе и наведена коришћена једињења, укључујући и њихове произвођаче. Овај део дисертације је написан јасно и прецизно и омогућава читаоцу да и сам изведе експерименте приказане у овој дисертацији. Најпре су наведени реагенси, раствори и медијуми коришћени током израде експеримената, а онда је описана метода узгајања биљака, припреме и карактеризације екстракта краставца. Потом следи целина посвећена методама индукције ЕАЕ, где су детаљно приказане експерименталне животиње, начин имунизације и евалуација клиничке слике ЕАЕ. Након тога су приказани поступци изоловања ћелија и ткива, укључујући ћелије дренирајући лимфних чворова, CD4⁺Т лимфоцита, инфилтрате имунских ћелија у кичмене мождине, ћелија перитонеалног испирка, дендритских ћелија пореклом из костне сржи. У овом делу је детаљно приказана магнетна сепарација CD4⁺ Т лимфоцита, бројање ћелија и успостављање култура сваког од наведених типова ћелија. У следећем поглављу су описани тестови за одређивање функција имунског система, укључујући мерење вијанбилности ћелија тестовима МТТ и кристал виолет, мерење продукције цитокина тестом ЕЛИЗА, имунофлуоресцентна бојења површинских молекула и следствена проточна цитофлуориметрија, мерење нивоа апоптозе бојењем анексином, одржевање фагоцитозе флуоресцентно обележеним куглицама од полистирена, мерење продукције реактивних врста кисеоника бојењем дихидроксиродамином и азот монооксида методом по Грису. Потом је објашњена метода реакције ланчаног умножавања, укључујући изоловање РНК, реакцију реверзне транскрипције и квантитативну реакцију ланчаног умножавања у реалном времену. Наведени су сви коришћени прајмери и описан начин израчунавања релативне експресије иРНК и миРНК. Овде посебно наглашавамо иновативну методу детекције експресије миРНК. У следећем поглављу је приказана коришћена методологија имуноблота, укључујући мерење протеина у узорцима по Лорију, електрофореза на СДС полиакриламидним геловима, трансфер протеина на поливинилидендифлуоридну мембрану, визуелизација трака и дензитометријска анализа. Даље, описани су тестови за анализу токсичног утицаја агенаса на моделу рибе зебрице. Коначно, приказани су адекватни статистички тестови који су коришћени за обраду резултата у оквиру програма Граф Пад Призм 7.

У поглављу **Резултати**, кандидат је јасно и прегледно приказао резултате својих истраживања у оквиру 16 поглавља. Свако од поглавља је целина у којој је прецизно уведен предмет истраживања, у којој су описани поступци који су коришћени, резултати који су добијени и конкретни закључци о добијеним резултатима. Ова поглавља су јасно логички повезана и читаоцу је лако да прати ток истраживања. Она, такође, у потпуности одговарају постављеним циљевима, и из њих се изводе закључци дисертације. У првим поглављима је показано на који начин су одабрани методи екстракције и лист као орган који се показао најбољим за даље експерименте. Тако је у првом поглављу приказана упоредна анализа имуномодулацијског ефекта различитих екстракта листа краставца на ћелијама дренирајућих лимфних чворова и пречишћеним CD4⁺ Т лимфоцитима *in vitro*, а у следећем упоредна анализа имуномодулацијског ефекта екстракта корена, стабла и листа краставца на ћелијама дренирајућих лимфних чворова *in vitro*. Потом следи група поглавља која су посвећена имуномодулацијском утицају екстракта листа краставца на CD4⁺ Т лимфоците и на имунске ћелије црева *in vitro*, као и инфилтрате кичмене мождине *ex vivo*. Следи приказ имуномодулацијског утицаја екстракта листа краставца на макрофагима и на дендритским ћелијама *in vitro*. Потом је приказан имуномодулацијски утицај екстракта листа краставца на енцефалитогене ћелије *in vivo* и *ex vivo*, као и његов ефекат на клинички ток експерименталног аутоимуноског енцефаломијелитиса и на развој

ембриона зебрице. Следи поглавље које приказује квалитативну и квантитавну анализу екстракта листа краставца, која је довела до истраживања конкретних активних супстанце екстракта: кукурбитацина Б и кукурбитацина Е, а потом поглавља која приказују имуномодулацијски утицај ових једињења на ћелије дренажујућих лимфних чворова, на пречишћене CD4⁺ Т лимфоците, макрофаге и на инфилтрате кичмене мождине *in vitro*, као и њихов ефекат на развој ембриона зебрице.

У поглављу **Дискусија** је поново наглашен значај проналаска нових лекова за аутоимунске болести, укључујући мултиплу склерозу. Објашњено је да биљке представљају богат извор активних биодједињења, те да је краставац биљка богата потенцијално имуномодулаторним једињењима. Продискутован је начин екстракције који је изабран као оптималан за ово истраживање, као и разлози одабира екстракта листа за даља истраживања. Објашњено је да су у студији испитивани утицаји на имунске ћелије пореклом из дренажујућих лимфних чворова, лимфног ткива црева, кичмене мождине. Наглашено је да су истраживања рађена, пре свега на Т лимфоцитима, да је испитивана њихова способност да продукују цитокине IFN- γ и IL-17 који су основни цитокини помоћничких Т лимфоцита типа 1 и 17, као и путеви сигналне трансдукције одговорни за запажене ефекте. Такође, образложено је и зашто су у истраживања биле укључене и друге имунске ћелије, односно макрофаги и дендритске ћелије. Потом је продискутивана метода којом су квалитативно и квантитативно анализирани испитивани екстракти и који су разлози одабира кукурбитацина Б и Е за даља истраживања. Објашњено је зашто је коришћен модел рибе зебрице, као и основни модел овог истраживања експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ).

У наредном поглављу је детаљно продискутована припрема екстракта уз цитирање адекватних научних радова, као и разлози одабира екстракта листа краставца, кукурбитацина Б и Е за детаљна истраживања анти-енцефалитогеног дејства. Затим је објашњен значај налаза да испитивани агенси инхибирају продукцију IFN- γ и IL-17 у различитим коришћеним експерименталним системима. Наглашена је улога ових цитокина и Т лимфоцита који их продукују за патогенезу мултипле склерозе и ЕАЕ. Такође, објашњено је зашто је одсуство ефекта испитиваних агенаса на продукцију анти-инфламаторног цитокина IL-10 битно за њихово анти-енцефалитогено дејство. Посебно је продискутован налаз *in vivo* примене екстракта листа краставца у ЕАЕ. Затим је објашњен значај испитиваних сигналних путева (NF- κ B, p38 MAPK, STAT3) за активност енцефалитогених ћелија, као и значај налаза да испитивани агенси модулишу пренос сигнала овим путевима. Објашњено је зашто су у истраживања биле укључене miR-146, miR-155 i *Cyp1a*, као и значај њихове модулације за запажена анти-енцефалитогена дејства, а пре свега за модулацију помоћничких Т лимфоцита. Детаљно су упоређени резултати добијени испитивањем ових сигналних путева са резултатима других група добијеним у сличним системима и дат је критички поглед на сопствене и туђе резултате. Слично, објашњен је и значај добијених резултата испитивања екстракта листа краставца и кукурбитацина Б и Е на ћелије урођене имуности, макрофаге и дендритске ћелије. Наглашен је значај модулације продукције NO и реактивних врста кисеоника у светлу њихове улоге у мултиплој склерози и ЕАЕ. Такође, продискутован је и значај инхибиције презентације антигена Т лимфоцита од стране макрофага и дендритских ћелија, као и рестрикције у продукцији проинфламаторних цитокина од стране ових ћелија за анти-енцефалитогено дејство.

Потом је објашњен значај налаза добијених у моделу зебрице у светлу могуће примене испитиваних агенаса *in vivo*. Коначно, продискутован је крунски налаз ове дисертације, а то је ефекат екстракта листа краставца на ЕАЕ, односно на аутоимуност усмерену против централног нервног система *in vivo*.

Дискусија се завршава навођењем даљих могућих праваца истраживања и наглашавањем да резултати ове докторске дисертације указују да су екстракти краставца и њихове активне супстанце вредне даљег испитивања у смислу њиховог анти-енцефалитогеног дејства.

Дискусија се логично наставља у поглавље **Закључци**. У њему су закључци наведени према претходно наведеним конкретним циљевима, а формиран на основу солидних резултата и конкретне дискусије. Конкретно, закључци су:

1. Припремљени екстракти корена, листа и стабла краставца су остварили имомодулацијске ефекте у *in vitro* уловима на ћелије ДЛЧ и CD4⁺ лимфоците с тим што је екстракт листа краставца (ЕЛК) остварио најизраженије антиенцефалитогено дејство.
 2. Фитохемијска анализа ЕЛК методом масене спектрометрије утврдила је присуство 37 различитих једињења у екстракту, међу којима су класа једињења тетрацикличних терпена кукурбитацина далеко најзаступљенија, а посебно једињења кукурбитацин Ц 2-О хексозид и кукурбитацин Ц.
 3. ЕЛК је инхибирао Th1 и Th17 аутоимунски одговор *in vitro* и *in vivo*, као и ефекторске функције макрофага и антиген-презентујућу активност дендритских ћелија.
 4. Примена ЕЛК *in vivo* је ублажила клинички ток ЕАЕ у почетним фазама болести.
 5. Једињења КукБ и КукЕ су остварила сличне ефекте као и ЕЛК на CD4⁺ лимфоците и макрофаге, инхибирајући енцефалитогени потенцијал ових ћелија *in vitro*.
 6. Цитотоксична анализа ЕЛК, КукБ и КукЕ на моделу зебрице показала је да концентрације које остварују биолошку активност *in vitro* не утичу на цитотоксичност у овом модел систему.
- Коначно дат је и општи закључак да су екстракт листа краставца и кукурбитацини Б и Е потентни анти-енцефалитогени агенси.

У поглављу **Литература** са 270 библиографских јединица релевантних по избору и броју, уз навођење најскоријих литературних података, види се озбиљан и студиозан приступ проблематици од стране кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Jevtić B**, Djedović N, Stanisavljević S, Despotović J, Miljković D, Timotijević G. Cucurbitacin E Potently Modulates the Activity of Encephalitogenic Cells. J Agric Food Chem. 2016 Jun 22;64(24):4900-7. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00951. (M21a) <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b00951>
2. **Jevtic B**, Djedovic N, Stanisavljevic S, Gasic U, Misic D, Despotovic J, Samardzic J, Miljkovic D, Timotijevic G, Anti-encephalitogenic effects of cucumber leaf extract. J Funct Food. 2017 Oct; 37:249-262. doi: 10.1016/j.jff.2017.07.060. (M21) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617304486?via%3Dihub>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:

1. **Bojan Jevtić**, Suzana Stanisavljević, Djordje Miljković, Gordana Timotijević. Effects of cucumber extracts on cytokine production in encephalitogenic cells. 2nd International Conference on Plant Biology. Book of Abstracts, stranica 67, Petnica, Srbija, Jun 2015.

Б4. Конгресна саопштења на домаћим конгресима:

1. **Bojan Jevtić**, Neda Djedović, Suzana Stanisavljević, Djordje Miljković, Gordana Timotijević. Kukurbitacin E inhibira encefalitogene T limfocite. Program i knjiga apstrakata, stranica 23 VII naučni sastanak Društva imunologa Srbije. Beograd, Srbija, April 2016.
2. **Bojan Jevtić**, Neda Djedović, Suzana Stanisavljević, Djordje Miljković, Gordana Timotijević. Cucumber leaf extract inhibits encephalitogenic cells. 7th Congress of Serbian Neuroscience Society. Book of Abstracts, stranica 73, Beograd, Srbija, Oktobar 2017.
3. **Bojan Jevtić**, Suzana Stanisavljević, Djordje Miljković, Gordana Timotijević. Cucurbitacin E inhibits effector cytokine production in encephalitogenic cells. 5th Conference of Serbian Biochemical Society. Proceedings, stranica 105, Beograd, Srbija, Novembar 2015.

Мишљење и предлог Комисије:

Анализа докторске дисертације кандидата **Бојана Јевтића** под насловом „**Утицај различитих екстраката краставца (*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) на енцефалитогени потенцијал Т лимфоцита пацова у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**” показује да је он у својој докторској тези успешно реализовао постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан и одлично конципиран експериментални рад. Докторска дисертација представља оригиналан научни рад у области имунологије који истражује могућност терапијске модулације мултипле склерозе. Ова болест је хронична инфламаторна демјелинизирајућа и неуродегенеративна болест ЦНС у чијој патогенези је аутоимунски одговор усмерен против ћелија и структура ЦНС од кључног значаја. Енцефалитогене ћелије, а пре свега Т лимфоцити и макрофаги су главни елементи овог аутоимунског одговора, те је ограничење њихових дејстава ефикасан терапеутски приступ. Самим тим, потентно супресивно дејство екстракта листа краставца коришћеног у овој студији, као и његових активних супстанци, кукурбитацина на Т лимфоците и макрофаге указује на потенцијал њихове примене у терапији аутоимунских болести ЦНС. Лек који доводи до потпуног излечења од мултипле склерозе не постоји, већ постојећи терапеутици само доводе до модификације тока болести. Такође, тренутно постојећи терапеутици имају изразито високу цену што спречава њихову масовну употребу. Дакле, проналажење нових лекова за мултиплу склерозу је императив истраживања у неуроимунологији. Ефикасност агенаса испитиваних у овој студији у деловању против енцефалитогених ћелија, као и практично одсуство испитиваних нежељених дејстава, јасно указују да су даља испитивања њихове потенцијалне примене у терапији мултипле склерозе обећавајућа.

Самосталност у планирању и експерименталној реализацији истраживања, као и у тумачењу и критичком разматрању резултата које је кандидат показао у раду, говоре о добром познавању научне области којој обрађена проблематика припада. Као резултат, истраживања приказана у овој дисертацији су публикована у два научна рада. Кандидат има укупно 12 радова из уже научне области, од чега 3 као први аутор што говори о његовом успешном научном раду и перспективности. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос докторске дисертације кандидата **Бојана Јевтића** „**Утицај различитих екстраката краставца (*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) на енцефалитогени потенцијал Т лимфоцита пацова у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**”, и предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

Др Гордана Тимотијевић, виши научни сарадник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство, Универзитет у Београду, ментор

Др Светлана Радовић, редовни професор, Биолошки
факултет, Универзитет у Београду, ментор

Др Ђорђе Миљковић, научни саветник, Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Универзитет у Београду, члан

У Београду, 04.05.2018. године.