

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 9.7.2018. godine,
broj 5940/17-IL, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod
naslovom:

**„Uticaj sistemske administracije lipopolisaharida na strukturne, celularne i
molekularne karakteristike slezine miša“**

kandidata dr Ivane Lalić, zaposlene na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Novica Milićević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Akademik Vladimir Bumbaširević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Dušan Popadić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Akademik Miodrag Čolić

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene
doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Ivane Lalić napisana je na ukupno 72 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 3 tabele, 6 grafikona i 7 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je detaljno opisana histološka građa slezine miša, uz poseban osvrt na razlike u histološkoj građi humane i mišje slezine. Pored toga, opisana su dosadašnja saznanja o putevima recirkulacije limfocita kroz slezinu miša. Definisano je šta su to hemokini i kakva je njihova uloga u imunskom sistemu. Navedena je detaljna klasifikacija hemokina i hemokinskih receptora. Detaljno je opisano šta je lipopolisaharid (LPS), kakva je njegova struktura i na koji način inicira intracelularne signalne puteve i produkciju proinflamatornih

medijatora. Takođe je opisan značaj receptora TNFR1 (engl. *tumor necrosis factor receptor-1*) u imunskom odgovoru na LPS. Na kraju uvoda, dat je osvrt na dosadašnja saznanja o uticaju LPS-a na migraciju različitih tipova ćelija unutar slezine miša. Pored toga, istaknut je značaj hemokinske osovine CCL20 – CCR6 u migraciji B limfocita u slezinu miša nakon tretmana sintetskim Nod1 agonistom, koji indukuje urođeni imunski odgovor *in vivo*.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se od: (1) ispitivanja uticaja sistemske administracije LPS-a na broj B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* i TNFR1^{-/-} (*tumor necrosis factor receptor-1 knockout*) miševa, 24 h nakon tretmana; (2) ispitivanja uticaja sistemske administracije LPS-a na strukturnu organizaciju slezine *wild-type* i TNFR1^{-/-} miševa, 24 h nakon tretmana; (3) ispitivanja uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokine i proinflamatorne citokine (*Xcl1, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl12, Cxcl13, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl17, Ccl19, Ccl20, Ccl21, Ccl22, Tnf, Il1b, Il6, Lta i Ltb*) u slezini *wild-type* miševa, 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana; (4) ispitivanja uticaja sistemske administracije LPS-a na ekspresiju gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine (beloj pulpi, crvenoj pulpi i marginalnoj zoni), kao i lokalizacije CCL20-produkujućih ćelija u slezini miša, 2 h nakon tretmana.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji koja je sprovedena na Institutu za anatomiju Univerziteta u Lübeck-u (Lübeck, Nemačka), na Institutu za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić" Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i na Institutu za biomedicinu i translacionu medicinu Univerziteta u Tartu-u (Tartu, Estonija). U istraživanju su korišćeni *wild-type* miševi soja C57BL/6 i TNFR1^{-/-} miševi istog soja. Detaljno je opisan tretman miševa LPS-om, kao i postupak uzimanja uzoraka tkiva slezine. Opisane su imunohistohemijske metode, kao i morfometrijska analiza koja je sprovedena na imunohistohemijski obojenim isečcima slezine. Pored toga, dat je detaljan opis kvantitativnog *real-time* PCR-a (qRT-PCR), laserske mikrodisekcije i imunofluorescentnih metoda, primenjenih na tkivu slezine. Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa etičkim principima i smernicama za brigu o dobrobiti eksperimentalnih životinja i odobreni su od strane od strane Ministarstva energetike, poljoprivrede, životne sredine i ruralnih područja (Kiel, Nemačka), Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 146 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U crvenoj pulpi slezine netretiranih *wild-type* miševa uočen je veliki broj B limfocita. U poređenju sa brojem B limfocita, broj T limfocita u crvenoj pulpi bio je statistički visoko značajno manji. Dvadeset četiri časa nakon systemske administracije LPS-a, uočeno je statistički visoko značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* miševa. Kod *wild-type* miševa tretiranih LPS-om, 24 h nakon tretmana, uočeno je statistički visoko značajno povećanje procentualne zastupljenosti B ćelijske zone i bele pulpe u poređenju sa netretiranim *wild-type* miševima. S druge strane, morfometrijska analiza je pokazala statistički značajno smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone 24 h nakon systemske administracije LPS-a. Procentualna zastupljenost T ćelijske zone u odnosu na ukupnu površinu slezine miša ostala je nepromenjena 24 h nakon tretmana LPS-om.

U slezini netretiranih TNFR1^{-/-} miševa, crvena pulpa je bila gusto naseljena velikim brojem B limfocita. U odnosu na broj B limfocita, broj T limfocita u crvenoj pulpi bio je statistički visoko značajno manji. Dvadeset četiri časa nakon systemske administracije LPS-a, u slezini TNFR1^{-/-} miševa uočene su identične promene kao i kod *wild-type* miševa tretiranih LPS-om. Morfometrijskom analizom utvrđeno je statistički visoko značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine, 24 h nakon tretmana LPS-om. Dvadeset i četiri časa nakon systemske administracije LPS-a, u slezini TNFR1^{-/-} miševa, uočeno je statistički visoko značajno povećanje procentualne zastupljenosti B ćelijske zone i bele pulpe, kao i statistički visoko značajno smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone u poređenju sa netretiranim TNFR1^{-/-} miševima. Procenat T ćelijske zone, kao i kod *wild-type* miševa, ostao je nepromenjen 24 h nakon tretmana LPS-om.

Kako bi se ispitao uticaj LPS-a na ekspresiju gena za homeostatske i proinflamatorne citokine u mišjoj slezini 1 h, 2 h i 24 h nakon tretmana, primenjena je metoda qRT-PCR-a. Kvantitativnom *real-time* PCR analizom, detektovana je povećana ekspresija gena 11 hemokina i proinflamatornih citokina: XCL1, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5,

CCL17, CCL20, CCL22, TNF i $LT\alpha$. Nivo ekspresije gena za homeostatski hemokin CXCL13 ostao je nepromenjen nakon tretmana LPS-om. Dodatno, nivoi iRNK za homeostatske hemokine CXCL12 i CCL19 značajno su se smanjili 2 h i 24 h nakon intravenske injekcije LPS-a. Homeostatski hemokin CCL21 takođe je pokazao značajno smanjen nivo iRNK 24 h nakon tretmana LPS-om.

Dva sata nakon sistemske administracije LPS-a, analizirana je ekspresija gena za hemokin CCL20 u različitim odeljcima tkiva slezine (beloj pulpi, crvenoj pulpi i marginalnoj zoni), dobijenih primenom laserske mikrodisekcije. Metodom qRT-PCR-a utvrđeno je da LPS indukuje produkciju CCL20 u beloj pulpi slezine miša, dok u marginalnoj zoni i crvenoj pulpi ovaj hemokin nije detektovan. Dva sata nakon sistemske administracije LPS-a, ispitivana je lokalizacija CCL20-produkujućih ćelija u beloj pulpi slezine miša. Imunofluorescentna analiza je pokazala da su CCL20-produkujuće ćelije lokalizovane u T ćelijskoj zoni (PALS-u, engl. *periarterial lymphatic sheath*), dok je izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija ravnomerno raspoređen u B ćelijskoj zoni.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dosadašnja istraživanja su pokazala da LPS indukuje migraciju nekoliko ćelijskih tipova unutar slezine miša (De Smedt i sar., 1996; Groeneveld i sar., 1983; Groeneveld i sar., 1985; Kestemann i sar. 2008; Reis e Sousa i sar., 1997). Koliko nam je poznato, nema podataka o uticaju LPS-a na populaciju B i T limfocita u crvenoj pulpi mišje slezine.

Rezultati ove doktorske disertacije potvrdili su nalaze prethodne studije da se u crvenoj pulpi slezine miša nalazi veliki broj B i T limfocita (Nolte i sar., 2000), kao i da je broj B limfocita u crvenoj pulpi veći u odnosu na broj T limfocita (Nolte i sar., 2000). Dvadeset četiri časa nakon intravenske injekcije LPS-a uočeno je značajno smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine *wild-type* miševa. Ove promene bile su praćene značajnim povećanjem procentualne zastupljenosti bele pulpe i B ćelijske zone, kao i smanjenjem procentualne zastupljenosti marginalne zone 24 h nakon tretmana (Groeneveld, 1985). Imajući u vidu sve opisane promene, moglo bi se zaključiti da intravenski ubrizgan LPS izaziva relokaciju B limfocita iz crvene pulpe i marginalne zone (Groeneveld, 1985) u B ćelijsku zonu bele pulpe slezine. S druge strane, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da smanjenje broja T limfocita u crvenoj pulpi slezine 24 h nakon tretmana LPS-om nije praćeno povećanjem procentualne zastupljenosti T ćelijske zone. Stoga ostaje nejasno kojim putem T limfociti napuštaju crvenu pulpu i koja je njihova konačna odrednica. U istraživanju koje je sprovedeno

na pacovima (Semaeva i sar., 2010), uočen je povećan efluks T limfocita, kao i smanjen efluks B limfocita iz slezine rano nakon tretmana LPS-om. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je masivna relokacija limfocita iz crvene pulpe slezine nezavisna od TNFR1 signalnog puta. Imajući u vidu da je 24 h nakon sistemske administracije LPS-a i kod *wild-type* i kod TNFR1^{-/-} miševa uočeno značajno povećanje procentualne zastupljenosti bele pulpe i B ćelijske zone, značajno smanjenje procentualne zastupljenosti marginalne zone i nepromenjen procentualni udeo T ćelijske zone, može se pretpostaviti da se bela pulpa povećava zahvaljujući uvećanju B ćelijske zone.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da veoma rano nakon intravenske administracije LPS-a dolazi do povećanja ekspresije iRNK za 11 hemokina i proinflammatoryh citokina (XCL1, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, TNF i LTα) u slezini miša. Dva sata nakon tretmana LPS-om, uočena je viša ekspresija hemokina XCL1, koji se proizvodi tokom infekcije i inflamacije od strane različitih ćelijskih tipova (Lei i Takahama, 2012). Kod miševa, XCR1 (receptor za XCL1) selektivno je eksprimiran od strane CD8⁺ subpopulacije dendritskih ćelija, koje su smeštene u crvenoj pulpi, marginalnoj zoni i T ćelijskoj zoni (Dorner i sar., 2009). Jedan sat nakon tretmana LPS-om, u slezini miša uočena je značajno viša ekspresija iRNK za proinflammatory citokin TNF. Ovakav nalaz u skladu je sa rezultatima nedavnog istraživanja u okviru koga je detektovana povećana koncentracija TNF u slezini miša 1 h nakon intraperitonealne injekcije LPS-a (Hasegawa-Ishii i sar., 2016). Dodatno, u okviru studije koja je sprovedena na pacovima (Semaeva i sar., 2010), uočeno je značajno povećanje koncentracije proinflammatoryh (TNF, IL-1β, IL-6) i anti-inflammatoryh citokina (IL-10) u serumu i limfi koja potiče iz slezine, u prva tri sata nakon intravenske injekcije LPS-a. Semaeva i sar. (2010) su pretpostavili da u odgovoru na LPS dolazi do lokalne produkcije proinflammatoryh i anti-inflammatoryh citokina unutar slezine, kao i da slezina na ovaj način snabdeva sistemska cirkulaciju citokinima koji mogu da regulišu inflamatorni odgovor. Rezultati ove doktorske disertacije takođe su pokazali da tretman LPS-om indukuje povećanu ekspresiju CCL3, CCL4 i CCL5, koji spadaju u grupu "inflammatoryh" hemokina i imaju značajnu ulogu u regrutovanju efekatorskih ćelija (Marques i sar., 2013; Menten i sar., 2002; Moser i Loetscher, 2001). Ovakav nalaz u skladu je sa rezultatima istraživanja u okviru koga je detektovana povećana koncentracija CCL3 i CCL4 u slezini miša 1 h nakon intraperitonealne injekcije LPS-a (Hasegawa-Ishii i sar., 2016). Glavni homeostatski hemokini koji regulišu naseljavanje T limfocita u T ćelijsku zonu bele pulpe slezine su CCL19 i CCL21 (Griffith i sar., 2014; Fritz i Gommerman, 2011; Schulz, 2016).

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da nivoi iRNK za hemokine CCL19 i CCL21 nisu bili povišeni nakon sistemske administracije LPS-a. Zapravo, relativna ekspresija gena za CCL19 bila je značajno smanjena 2 h i 24 h nakon tretmana. Takođe, nivo ekspresije gena za CCL21 bio je značajno smanjen 24 h nakon tretmana. S druge strane, qRT-PCR analiza je pokazala značajno povećanje ekspresije iRNK za hemokine CCL17 i CCL22, koji bi mogli biti odgovorni za migraciju T limfocita u slezini. Hemokinski receptor CCR4 (receptor za CCL17 i CCL22) predominantno je eksprimiran od strane Th2 limfocita, Treg limfocita, Th17 limfocita i Th22 limfocita (Yoshie i Matsushima, 2015). Rezultati ove doktorske disertacije, takođe su pokazali povećanu ekspresiju iRNK za hemokine CXCL9 i CXCL10. CXCL9 i CXCL10 dele zajednički receptor CXCR3 (Loetscher i sar., 1996; Loetscher i sar., 1998; Lu i sar., 1999), koji je indukovan na naivnim T limfocitima veoma brzo nakon aktivacije (Groom i Luster, 2011a; Groom i Luster, 2011b). Receptor CXCR3 ostaje visoko eksprimiran na Th1 CD4⁺ T limfocitima, efektorskim CD8⁺ T limfocitima, NK ćelijama i NKT ćelijama (Groom i Luster, 2011a; Groom i Luster, 2011b). Kod miševa, samo aktivirani, ali ne i mirujući, B limfociti se boje antitelima na receptor CXCR3 (Bowman i sar., 2000; Park i sar., 2002). Park i sar. (2002) su pokazali da je za odgovor na CXCL9 glodara potrebno najmanje četiri dana aktivacije B limfocita *in vitro*. Glavni homeostatski hemokin koji u bazalnom stanju reguliše usmeravanje i naseljavanje B limfocita u B ćelijsku zonu bele pulpe slezine je CXCL13 (Schulz et al., 2016). U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije, ekspresija iRNK za hemokin CXCL13 ostala je nepromenjena nakon sistemske administracije LPS-a. S druge strane, 1 h i 2 h nakon tretmana LPS-om, uočena je značajno viša ekspresija iRNK za hemokin CCL20. Prethodna istraživanja su pokazala da hemokin CCL20 i njegov receptor CCR6 mogu imati ulogu u privlačenju nezrelih dendritskih ćelija, T limfocita, B limfocita i, u manjoj meri, neutrofilnih granulocita i NK ćelija (Schutyser i sar., 2003). U istraživanju okviru ove doktorske disertacije, detektovano je značajno povećanje ekspresije proinflatornog citokina TNF, za koga je prethodno pokazano da stimuliše produkciju CCL20 od strane reumatoidnih sinovijalnih ćelija koje nalikuju fibroblastima, *in vitro* (Kawashiri i sar., 2009). Nedavna studija ukazala je na značaj hemokinske osovine CCL20 – CCR6 u migraciji B limfocita nakon tretmana sintetskim Nod1 agonistom, FK156, koji kod miševa indukuje urođeni imunski odgovor *in vivo* (Paradis i sar., 2014). Sistemska administracija FK156, izazvala je smanjenje broja B limfocita u krvi, kao i brzu akumulaciju B limfocita u slezini (Paradis i sar., 2014). Imajući u vidu blisku vezu između ćelijskih elemenata krvi i Bilotovih putanja crvene pulpe slezine, rezultati pomenutog istraživanja (Paradis i sar., 2014) i rezultati ove doktorske disertacije kolektivno ukazuju na to da CCL20

može imati važnu ulogu u regulaciji migracije B limfocita u slezinu. Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da CCL20 indukovani LPS-om potiče iz bele pulpe mišje slezine. Ostaje nejasno koji ćelijski tip ima ulogu u produkciji CCL20, a potencijalni kandidati mogu biti stromalne ćelije (Paradis i sar., 2014), CD4⁺ T limfociti (Elgueta i sar., 2015) ili dendritske ćelije (Homey i sar., 2000).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Ivana M. Lalić, Rudolf Bichele, Anja Repar, Sanja Z. Despotović, Saša Petričević, Martti Laan, Pärt Peterson, Jürgen Westermann, Živana Milićević, Ivana Mirkov, Novica M. Milićević. Lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor receptor-1 independent relocation of lymphocytes from the red pulp of the mouse spleen. Ann. Anat. 2018; 216: 125-134.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj sistemske administracije lipopolisaharida na strukturne, celularne i molekularne karakteristike slezine miša“ dr Ivane Lalić, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja LPS-a na B i T limfocite crvene pulpe slezine miša. Rezultati doktorske disertacije govore u prilog tome da intravenski ubrizgan LPS indukuje dramatično smanjenje broja B i T limfocita u crvenoj pulpi slezine miša, koje je nezavisno od TNFR1 signalnog puta. Rano nakon tretmana LPS-om, qRT-PCR analiza slezine miša pokazala je povećanje ekspresije iRNK za brojne hemokine i proinflamatorne citokine (XCL1, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, TNF i LT α), koji mogu uticati na aktivnost i kretanje B i T limfocita. Primenom laserske mikrodisekcije i sledstvenog qRT-PCR-a, pokazano je da LPS indukuje produkciju CCL20 u beloj pulpi slezine miša. Imunofluorescentna analiza je pokazala da su CCL20-produkujuće ćelije lokalizovane u PALS-u, dok je izvestan broj manjih CCL20-produkujućih ćelija ravnomerno raspoređen u B ćelijskoj zoni. Rezultati ove doktorske disertacije mogli bi da doprinesu boljem razumevanju razvoja imunskog odgovora na mikrobne komponente. Ovakve studije u kojima se ispituje uticaj LPS-a na slezinu su od velikog značaja, jer mogu da unaprede naše znanje o tome kako mikrobni produkti oblikuju strukturu limfatičnih organa. Ovaj tip istraživanja potom se može proširiti na mnogo složenije sisteme u kojima bi se koristili drugi molekuli sa sličnim uticajem na imunski sistem.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Ivane Lalić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 18.7.2018. godine

Članovi Komisije:

Akademik prof. dr Vladimir Bumbaširević

Mentor:

Prof. dr Novica Milićević

Prof. dr Dušan Popadić

Akademik Miodrag Čolić
