

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На I редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 11.10.2021. године, на основу молбе ментора, Миљане Момчиловић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, и Биљане Божић Недељковић, редовног професора Биолошког факултета, Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милице Н. Лазаревић**, истраживача сарадника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом: „Утицај донора водоник-сулфида, морфолин-4-иум-4-метоксифенил (морфолино)-фосфодитионата, на карактеристике имунских ћелија укључених у патогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, у саставу:

1. др Ђорђе Миљковић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду
2. др Данијела Лакета, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
3. др Жељка Станојевић, доцент, Медицински факултет, Универзитет у Београду

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

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Милице Н. Лазаревић под насловом „Утицај донора водоник-сулфида, морфолин-4-иум-4-метоксифенил (морфолино)-фосфодитионата,

на карактеристике имунских ћелија укључених у патогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса” обухвата 109 страница текста и 27 слика. Текст се састоји од 7 поглавља и то: Увод (16 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (14 страна), Резултати (37 страна), Дискусија (11 страна), Закључци (2 стране) и Литература (21 страна).

Предмет докторске дисертације је испитивање утицаја донора водоник-сулфида, морфолин-4-иум-4-метоксифенил (морфолино)-фосфодитионата (GY4137) на фенотипске и функционалне карактеристике имунских ћелија укључених у патогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ) у пацова соја DA и/или мишева соја C57BL/6.

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у Одељењу за имунологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, а процедуре које су укључивале рад са животињама су одобрене од стране Етичког комитета истог института (решење бр. 4-10/19, веза 01-2279 од 11.10.2019.).

Резултати истраживања које је кандидаткиња Милица Н. Лазаревић приказала у овој дисертацији пружају нова сазнања о потенцијалу GY4137, спороослобађајућем донору H₂S, у терапији ЕАЕ, аутоимунске болести централног нервног система (ЦНС). ЕАЕ је најчешће коришћен животињски модел за проучавање мултипле склерозе (МС). Ова болест је хронична, инфламацијска, демјелинизациона и неуродегенеративна болест која погађа релативно младу и радно способну популацију. Упркос напретку у терапији још увек не постоји одговарајући лек који доводи до излечења од ове болести. Стога су научно оправдана истраживања на ЕАЕ која би довела до нових терапија МС. Овим истраживањима припадају и она изведена у оквиру ове докторске дисертације. Истраживања спроведена у овој докторској дисертацији су била посвећена и испитивању улоге H₂S у функционисању имунског система, те имају и базични значај. Резултати ове тезе указали су на антиинфламацијски и антиенцефалитогени потенцијал GY4137 у ЕАЕ, као и на базичну улогу H₂S у имуномодулацији. Конкретно, показано је да GY4137 остварује изражено антиинфламацијско дејство на ћелије микроглије које су резидентне

ћелије ЦНС и имају изузетно значајну улогу у патогенези ЕАЕ и МС. Интересантно, показано је да овај дозор доводи до потенцијације продукције реактивних врста кисеоника (енгл., reactive oxygen species, ROS) у ћелијама микроглије, али не и периферних макрофага. Такође, у одређеној мери GYY4137 потенцира толерогена својства дендритских ћелија (Дћ), које су од кључног значаја за отпочињање и обликовање имунског одговора. Даље, овај дозор H₂S супримира ефекторске функције енцефалитогених Т ћелија, доводећи до инхибиције продукције и/или ослобађања кључних инфламацијских цитокина интерлеукина 17 (енгл., interleukin-17, IL-17) и интерферона-гама (енгл., interferon-gamma, IFN- γ). Под утицајем GYY4137 долази до преваге регулаторних у односу на ефекторске Т лимфоците међу ћелијама изолованим из ЦНС животиња оболелих од ЕАЕ. Занимљиво је да се супротно дејство овог дозора показало на ћелијама добијеним из лимфних чворова имунизованих животиња. Негативан ефекат GYY4137 на регулаторне Т лимфоците, остварен је смањењем експресије транскрипционог фактора FoxP3. Резултати ове докторске дисертације указују на то да GYY4137 остварује имуномодулацијски ефекат на имунске ћелије укључене у патогенезу ЕАЕ, при чему природа и интензитет овог ефекта зависе од ћелијске популације на коју се дејство остварује, као и од миљеа из којег ћелије потичу.

АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод докторске дисертације има шест делова у којима су приказани релевантни подаци за разумевање теме ове докторске дисертације. У првом делу дате су основне карактеристике МС, укључујући клиничке и епидемиошке податке, као и важеће претпоставке о настанку ове болести. У другом делу су приказани постојећи лекови који се користе да би се успорио и модификовао ток болести. У трећем делу је приказан ЕАЕ, као најчешће коришћен анимални модел у испитивању патогенезе и терапије МС. Наведени су основни подмодели, и наглашене предности и мане коришћења ЕАЕ у проучавању МС. Укратко је описан и важећи концепт патогенезе активно индукованог ЕАЕ. У четвртом делу се детаљније говори о патогенези МС кроз анализу улоге Дћ, Т лимфоцита и микроглије/макрофага као ћелијских популација које имају изузетан значај

за овај процес. У петом делу говори се о познатим ефектима H_2S на имунски одговор, у различитим *in vitro* системима и анималним моделима. У шестом делу детаљно је приказан донор H_2S GYY4137, укључујући његова позната хемијска и имуномодулацијска својства. Коначно, дати су и разлози који стоје иза проучавања спроведених у овој докторској дисертацији.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања** кандидаткиња на основу досадашњих података о имуномодулацијском, антиоксидативном и неуропротективном дејству H_2S , поставља основни циљ овог истраживања – да се испита имуномодулацијско дејство спороослобађајућег донора H_2S , GYY4137, на ћелије имунског система укључене у патогенезу ЕАЕ, као и да се кроз утврђивање ефекта GYY4137 испита допринос H_2S патогенези ЕАЕ и размотри евентуална могућност коришћења модулације нивоа H_2S у терапији МС. Из наведеног основног циља произашли су следећи специфични циљеви:

1. Да се у *in vitro* условима испита утицај GYY4137 на активирание BV2 микроглијске ћелије и ДТ
2. Да се у *ex vivo* условима испита утицај GYY4137 на имунске ћелије добијене из лимфних чворова који дренирају место имунизације експерименталних животиња
3. Да се у *ex vivo* условима испита утицај GYY4137 на имунске ћелије изоловане из кичмене мождине ДА пацова оболелих од ЕАЕ.

За сваки од наведених циљева дати су егзактни подаци о приступима који ће се користити за њихово постизање.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** описане су имунолошке и молекуларнобиолошке методе које су коришћене у реализацији постављених циљева. Прво су наведени реагенси, раствори и медијуми коришћени током израде експеримената. Потом је описано да су у експериментима коришћени женке пацова високосродног соја DA, као и мужјаци и женке мишева високосродног соја C57BL/6, те је дат детаљан протокол за њихову имунизацију у циљу индукције ЕАЕ. Такође, описан је и начин евалуације клиничке слике ЕАЕ. Даље су детаљно описане методе за изолацију и услови

за култивацију ћелија коришћених у експериментима, као и третмани којима су ове ћелије биле изложене. Конкретно, радило се о BV2 ћелијама, перитонеалним макрофагима, дендритским ћелијама, ћелијама лимфних чворова који дренирају место имунизације и имунским ћелијама изолованим из кичмене мождине. Такође, дат је и протокол за пречишћавање CD4⁺ Т лимфоцита из популације ћелија изолованих из лимфних чворова или кичмених мождина методом магнетне сепарације. Наведен је и начин одређивања броја ћелија у узорцима, уз помоћ боје трипан плаво и коришћењем микроскопа. Следећу групу описаних метода чине методе коришћене за испитивање функције ћелија имунског система - кристал виолет и МТТ тест (за одређивање вијабилности ћелија), ELISA (за одређивање концентрације цитокина у супенатантима ћелијских култура), као и метода реакције ланчаног умножавања у реалном времену RT-qPCR (за одређивање експресије информационалних РНК), којој су претходили изолација укупне РНК и реверзна транскрипција. У поменутој групи метода спада и проточна цитофлуориметрија, те су у овом делу наведени и протоколи за одређивање заступљености, типа и функционалног стања ћелија имунског система помоћу проточне цитофлуориметрије, укључујући одређивање нивоа апоптозе, фагоцитозе и продукције ROS. Описане су још две методе које припадају овој групи, а то су анализа ћелија у реалном времену апаратом xCELLigence Real Time Cell Analyzer, као и имуноблот за одређивање релативног нивоа експресије протеина. Коначно, наведене су и коришћене статистичке методе, као и софтвер који је коришћен за анализу добијених резултата.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате спроведених истраживања које је груписала у пет целина. Свака од целина састоји се од поглавља у којима су на конзистентан начин и графички документовано приказани добијени експериментални подаци.

У првом делу приказани су резултати добијени испитивањем имуномодулационог ефекта *in vitro* третмана GYY4137 на активираних BV2 ћелијама. Показано је да GYY4137, не утичући на вијабилност BV2 ћелијама, остварује имуномодулационо дејство на ове ћелије тако што смањује продукцију NO и проинфламационог цитокина TNF (енгл., tumor necrosis factor). Такође, GYY4137 смањује ниво фагоцитозе и експресију костимулаторних молекула CD40 и CD86 у овим ћелијама. У овој групи резултата кандидаткиња показује да

GY4137 специфично индукује повећање продукције ROS у BV2 ћелијама, не утичући на продукцију ROS у перитонеалним макрофагима C57BL/6 миша и DA пацова. Показано је и да GY4137 повећава продукцију ROS у BV2 ћелијама посредством ослобођеног H₂S јер су слични ефекти добијени применом другог донора H₂S. Такође, показано је и да GY4137 остварује брз и трајан ефекат на адхезивне интеракције ових ћелија.

У другој групи резултата испитан је *in vitro* утицај GY4137 на ДТ диференциране из костне сржи C57BL/6 мишева. Показано је да GY4137 остварује ограничени имуномодулацијски утицај на ове ћелије. Не утичући на њихову вијабилност, овај донор не мења продукцију ROS и проинфламацијских цитокина у ДТ, повећава експресију и продукцију антиинфламацијског цитокина TGF- β (енгл., transforming growth factor), али не утиче на релативни ниво експресије iRNK других молекула од значаја за толерогеноост ДТ. Такође, у овој групи резултата је приказано да GY4137 не утиче на ниво фагоцитозе и експресију молекула МНС II класе, CD40 и CD80 у ДТ.

У трећем делу резултата кандидаткиња прелази на *ex vivo* систем и ту показује да GY4137 остварује имуномодулацијски ефекат на имунске ћелије лимфних чворова који дренирају место имунизације (поплитеални лимфни чворови, ПЛЧ) имунизованих C57BL/6 мишева и DA пацова, тако што смањује продукцију енцефалитогених цитокина IL-17 и IFN- γ у овим ћелијама. Иако је утицао на концентрацију енцефалитогених цитокина, GY4137 није утицао на процентуалну заступљеност Th17 и Th1 лимфоцита, доминантних произвођача ових цитокина, унутар ПЛЧ. Поред изостанка ефекта на проценат Th17 и Th1 лимфоцита унутар популације ћелија ПЛЧ мишева и/или пацова, GY4137 није утицао ни на просечни ниво експресије IL-17 и IFN- γ по CD4⁺ Т ћелији, те се може претпоставити да ово једињење није утицало на синтезу наведених цитокина у Th17 и Th1 лимфоцитима. У овој групи резултата показано је и да GY4137 смањује удео Treg у популацији ћелија ПЛЧ мишева, при томе не мењајући удео Th17 ћелија. Показано је да GY4137 смањује удео Treg ћелија у популацији ћелија ПЛЧ мишева посредством ослобођеног H₂S. Такође, показано је и да GY4137 повећава продукцију ROS у CD4⁺ Т лимфоцитима ПЛЧ мишева, при чему је то повећање најизраженије у популацији Treg.

У четвртом делу кандидаткиња описује и механизме којима GY4137 остварује свој

ефекат на Treg ПЛЧ имунизованих C57BL/6 мишева у *ex vivo* условима. GYY4137 је довео до смањења удела Treg унутар популације ћелија ПЛЧ, при чему није индуковао повећану апоптозу и фероптозу у ћелијама ПЛЧ мишева. Такође, у овој групи резултата описано је смањење нивоа експресије протеина FoxP3 у CD4⁺ Т лимфоцитима ПЛЧ мишева под утицајем GYY4137, као и то да GYY4137 интерферира са процесом протеозомалне деградације у ћелијама ПЛЧ мишева. У CD4⁺ Т лимфоцитима ПЛЧ мишева смањује активацију киназе S6, али не утиче на активацију киназе Akt. Ови резултати су значајни јер показују да је механизам којим је GYY4137 остварио ефекат на удео Treg унутар популације ћелија ПЛЧ обухватао смањење нивоа транскрипционог фактора FoxP3, које је највероватније посредовано стимулацијом његове протеозомалне деградације.

У петој целини кандидаткиња показује да у *ex vivo* условима GYY4137 остварује имunosупресивно дејство на имунске ћелије изоловане из кичмене мождине ДА пацова оболелих од ЕАЕ тако што смањује продукцију енцефалитогених цитокина у овим ћелијама. GYY4137 смањује и проценат Th17 ћелија, а не утиче на проценат Treg ћелија у ћелијама инфилтрата кичмене мождине пацова оболелих од ЕАЕ. Са обзиром на то да имунске ћелије изоловане из кичмене мождине представљају *in vivo* рестимулисане ћелије, ефекат GYY4137 на продукцију цитокина у овим ћелијама додатно иде у прилог антиенцефалитогеној потентности овог донора.

Поглавље **Дискусија** кандидаткиња започиње рекапитулацијом добијених резултата. Затим, детаљно дискутује о значају добијених резултата, у светлу познатих чињеница и резултата које су раније добили други научници. Разматрање започиње делом посвећеним АПћ, где говори о потентном утицају GYY4137 на презентацију антигена од стране ћелија микроглије, али не и Дћ, детаљно анализира добијене резултате и објашњава их у светлу патогенезе ЕАЕ. У наредном делу дискутује друге резултате добијене на ћелијама микроглије и Дћ, а пре свега оне о утицају GYY4137 на продукцију цитокина од стране ових ћелија, опет у контексту патогенезе ЕАЕ. Посебну пажњу посвећује утицају овог донора на TNF у ћелијама микроглије и TGF- β у Дћ. Такође, детаљно дискутује и ефекте донора на продукцију NO и ROS. Пошто је испитивала утицај GYY4137 на ROS и у Т лимфоцитима, овде она уводи у дискусију утицај донора и на ове ћелије, да би у наредном делу прешла управо на објашњење добијених резултата на овим

ћелијама. Имајући у виду изузетан значај Th17 и Th1 ћелија, односно њихових ефекторских цитокина IL-17 и IFN- γ , за патогенезу ЕАЕ и МС, она управо овим ћелијама и цитокинима посвећује посебну пажњу. Такође, подједнаку пажњу посвећује утицају GYY4137 на Treg, а посебно објашњењу занимљивог опажања да је утицај донора на ове ћелије разнолик у зависности од тога да ли су ове ћелије добијене из ЦНС или лимфних чворова. Овде дискутује и резултате посвећене утицају донора на унутарћелијске механизме регулације експресије FoxP3, кључног транскрипционог фактора Treg, а посебно његовог утицаја на mTOR сигнални пут. Дискусију завршава адекватним закључним поглављем у коме укратко, али довољно садржајно апострофира значај кључних резултата добијених у дисертацији за разумевање патогенезе ЕАЕ и МС, као и за будућа истраживања у овој области.

Закључци докторске дисертације су наведени тако да су у потпуности комплементарни постављеним циљевима. Дати су конкретни закључци о утицају GYY4137 на микроглију и ДТ, на имунске ћелије добијене из лимфних чворова који дренирају место имунизације експерименталних животиња, као и на имунске ћелије изоловане из кичмене мождине ДА пацова оболелих од ЕАЕ. Изведен је и општи закључак да је дејство примењеног донора на испитиване имунске ћелије зависно од типа ћелије на које делује, као и од контекста у коме се ћелије налазе. Коначни закључак је да GYY4137 остварује имуномодулациско деловање на имунске ћелије од значаја за патогенезу ЕАЕ и МС, као и да имуномодулациски ефекти варирају у зависности од типа ћелија и средине у којој се ћелије налазе, те да постоје основе за даља истраживања примене модулятора H₂S у терапији МС.

У поглављу **Литература** са 255 библиографске јединице које су релевантне по избору и броју, уз навођење адекватних литературних података, види се кандидаткињин студиозан приступ проблематици.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Lazarević M**, Battaglia G, Jevtić B, Đedović N, Bruno V, Cavalli E, Miljković Đ, Nicoletti F, Momčilović M, Fagone P. Upregulation of Tolerogenic Pathways by the Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 and Impaired Expression of H₂S-Producing Enzymes in Multiple Sclerosis. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 10;9(7):608. **M21a категорија**

<https://www.mdpi.com/2076-3921/9/7/608/htm>

2. **Lazarević M**, Mazzon E, Momčilović M, Basile MS, Colletti G, Petralia MC, Bramanti P, Nicoletti F, Miljković Đ. The H₂S Donor GYY4137 Stimulates Reactive Oxygen Species Generation in BV2 Cells While Suppressing the Secretion of TNF and Nitric Oxide. *Molecules*. 2018 Nov 14;23(11):2966. **M22 категорија**

<https://www.mdpi.com/1420-3049/23/11/2966/htm>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Milica Lazarević**, Maria Sofia Basile, Paolo Fagone, Maria Cristina Petralia, Eugenio Cavalli, Ferdinando Nicolletti, Đorđe Miljković, Miljana Momčilović, The effect of H₂S donor GYY4137 on T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis, Serbian Biochemical Society Ninth Conference with international participation, 2019, Belgrade, Serbia, Proceedings. **M64 категорија**

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Анализа докторске дисертације кандидаткиње **Милице Н. Лазаревић** под насловом „Утицај донора водоник-сулфида, морфолин-4-нум-4-метоксифенил (морфолино)-фосфодитионата, на карактеристике имунских ћелија укључених у патогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“ показује да је кандидаткиња у својој докторској дисертацији успешно реализовала постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан и одлично конципиран експериментални рад. Докторска дисертација

представља оригиналан научни рад у области имунологије који истражује улогу H_2S у модулатији имунског одговора, кроз испитивање дејства донора GYY4137 на имунске ћелије од значаја за патогенезу ЕАЕ, аутоимунске болести ЦНС. Дакле, резултати добијени у овој дисертацији имају базични значај јер доприносе разумевању имуномодулаторних карактеристика водоник сулфида, али и примењивост јер указују да би модулатија имунског одговора путем H_2S донора могла бити коришћена у терапији хроничних инфламацијских и аутоимунских болести каква је и МС. Ова болест се одликује хроничном инфламацијом у ЦНС која доводи до демиелинизације и неуродегенерације. Са обзиром на то да лек који доводи до излечења од МС не постоји, налази ове докторске дисертације су од значаја за напредак истраживања у циљу проналажења нових потенцијалних терапијских приступа. Наиме, детаљно изучавање дејства GYY4137 на имунске ћелије релевантне за патогенезу аутоимуности ЦНС довело је до сазнања да GYY4137 поседује значајан антиинфламацијски и антиенцефалитогени ефекат, те да би на тај начин могао спречити инфламацију у ЦНС и следствено уништавање мијелина и неурона. Ови резултати указују да су смислена даља истраживања могућности примене GYY4137 и других донора водоник сулфида у лечењу МС. Такође, они подстичу и даља базична истраживања улоге H_2S у имунском одговору.

Самосталност у планирању и експерименталној реализацији истраживања, као и у тумачењу и критичком разматрању резултата које је кандидаткиња у раду на овој дисертацији показала, говоре о добром познавању научне области којој обрађена проблематика припада. Као резултат, истраживања приказана у овој дисертацији су публикована у два научна рада у којима је кандидаткиња први аутор. Поред ових радова, кандидаткиња је коаутор још три рада из области имунологије, од тога у једном први

аутор. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос младе истраживачице. Имајући у виду квалитет докторске дисертације кандидаткиње Милице Н. Лазаревић под насловом „Утицај донора водоник-сулфида, морфолин-4-иум-4-метоксифенил (морфолино)-фосфодитионата, на карактеристике имунских ћелија укључених у патогенезу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, укључујући допринос ове дисертације разумевању улоге H_2S функционисању имунског система, примењивост њених резултата за даља истраживања у области МС, испољену креативност и друге личне квалитете кандидаткиње, као и адекватну библиографију, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње Милице Лазаревић.

КОМИСИЈА:

У Београду, 12.10.2021. године.

др Ђорђе Миљковић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” -
Институт од националног значаја за Републику Србију
Универзитет у Београду

др Данијела Лакета, ванредни професор
Биолошки факултет
Универзитет у Београду

др Жељка Станојевић, доцент,
Медицински факултет
Универзитет у Београду