

NAU N O M V E U M E D I C I N S K O G F A K U L T E T A
U N I V E R Z I T E T A U B E O G R A D U

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, odluka broj 5940/4, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom
ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis*“**

Kandidata dr Ivane Miti , zaposlene u Institutu za primenu nuklearne energije u Beogradu kao istraživa saradnik na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju. Mentor je prof. dr Miloš Markovi , komentor je viši nau ni saradnik dr Nataša Ili .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dušan Popadi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Dr Ljiljana Sofroni -Milosavljevi , nau ni savetnik Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Vu evi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Ivane Miti napisana je na 124 strane i podeljena na slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 tabela i 38 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je opisana povezanost autoimunosti i infekcija različitim patogenima sa posebnim osvrtom na infekciju parazitom *Trichinella spiralis*. Navedena su i opisana imunomodulatorna svojstva infekcije ovim parazitom sa osvrtom na eksperimentalni model bolesti multiple skleroze - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE).

Opisana je imunopatogeneza multiple skleroze koja uključuje Th1 i Th17 limfocite, kao i citokine koje ove ćelije proizvode. Navedeni su i opisani prvi klinički pokušaji primene parazita u kliničkoj terapiji obolelih od autoimunskih bolesti, među njima i multiple skleroze. Definisana je problem pronalaska novih terapijskih pristupa kod obolelih od hroničnih inflamatornih bolesti i potreba za pronalaskom definisanih molekula poreklom od parazita koji bi potencijalno mogli biti korišćeni u terapiji ovih oboljelih sa obzirom da korišćenje živih parazita nije poželjan vid tretmana obolelih.

Ciljevi rada su jasno definisani i odnose se na ispitivanje uticaja ekskretorno-sekretornih produkata mišinskih larvi *T. spiralis* (ES L1) na tok i modulaciju EAE-a kao i na ispitivanje mehanizama koji se nalaze u osnovi tog uticaja. Ciljevi doktorske teze bili su da se ispita da li različite doze dendritskih ćelija (DC) stimuliranih ES L1 antigenima, aplikovanih DA pacovima 7 dana pre indukcije EAE-a, dovode do značajne redukcije simptoma autoimunske bolesti, kao i da li direktno davanje ES L1 antigena *T. spiralis* DA pacovima dovodi do modulacije EAE-a i, ukoliko dovodi, da se odredi na koji način to zavisi od doze i frekvencije davanja antigena. Kao cilj rada definisano je i praćenje produkcije pro-inflamatornih (IFN- γ , IL-17) i anti-inflamatornih citokina (IL-4, IL-10, TGF- β), kao i procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T-ćelija (Treg)

na sistemskom nivou (elije slezine) i na nivou ciljnog organa, tj. ki mene moždine (elije infiltrata) i to u induktivnoj, efektornoj i fazi oporavka od EAE-a.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti ra eni na Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu. Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Eti ke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i Eti ke komisije Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu i sprovedene u skladu sa eti kim principima i smernicama za brigu o životinjama. Opisane su eksperimentalne životinje koriš ene u ogledima, kao i postupak dobijanja ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis*. Precizno je naveden postupak dobijanja i kultivacije dendritskih elija poreklom iz DA pacova, kao i indukovanja autoimunske bolesti EAE-a kod životinja. Detaljno je opisan postupak pra enja životinja i odre ivanje parametara bolesti, kao i metodologija odre ivanja koncentracije pro- i anti-inflamatornih citokina i procentualne zastupljenosti Foxp3⁺ Treg elija u populaciji elija slezine i infiltrata ki mene moždine.

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

Diskusija predstavlja uporedan pregled dobijenih rezultata doktorske disertacije uz prikaz podataka drugih istraživanja. Dat je kriti ki osvrt na zna aj dobijenih rezultata i mogu nost primene novih vidova terapije autoimunskih bolesti.

Zaklju ci jasno prikazuju najvažnija saznanja koja su proistekla iz rezultata rada.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 279 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je dalo doprinos razjašnjavanju mehanizama kojima ekskretorno-sekretorni antigeni parazita *T. spiralis* modifikuju imunski odgovor doma ina tokom autoimunske bolesti EAE-a, bilo direktnom aplikacijom ili primenom dendritskih elija koje su ovim antigenima stimulisane *in vitro*.

Potvr eno je da se dendritske elije nakon stimulacije ES L1 antigenima parazita *Trichinella spiralis* (DC/ES L1) mogu ozna iti kao tolerogene DC i njihova primena imala je inhibitorni efekat na razvoj EAE-a. Najve i uticaj na smanjenje težine bolesti ostvaren je

primenom doze od 5×10^6 DC/ES L1. U osnovi fenomena redukcije simptoma autoimunske bolesti nalazi se polarizacija imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa praćena povećanom produkcijom IL-4, IL-10 i TGF- β , a smanjenom produkcijom proinflamatornih citokina IFN- γ i IL-17. Takođe, primena DC/ES L1 dovodi do povećanja procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u populaciji T-limfocita na sistemskom nivou, u slezini, kao i u CNS-u na nivou ciljnih organa.

Po prvi put je pokazano da i direktna aplikacija različitih doza ES L1 antigena parazita *T. spiralis* DA pacovima u različitim terminima pre početka autoimunske bolesti može dovesti do modulacije EAE-a na doznom zavisanoj osnovi. Najniža primenjena doza ES L1 (150 μ g), data u jednom terminu (7. dana) pre indukcije EAE-a, nije imala uticaj na tok bolesti. Doza od 150 μ g data u dva termina (14. i 7. dana), kao i doza od 250 μ g ES L1 data u jednom terminu pre indukcije EAE-a, dovele su do ublažavanja bolesti, ali je najveći efekat ostvaren primenom doze od 250 μ g koja je data u dva termina (14. i 7. dana) pre indukcije EAE-a što se manifestovalo kroz odlaganje početka bolesti, smanjenje incidencije, supresije razvoja kliničkih znakova i skraćivanje trajanja bolesti. Profilaktička primena izolovanih ES L1 antigena indukuje ubedljiv Th2 odgovor na sistemskom i lokalnom nivou, kao i anti-inflamatorni odgovor na nivou ciljnih tkiva, uz smanjenu produkciju pro-inflamatornih citokina, bez značajnog uticaja na promenu produkcije anti-inflamatornih i regulatornih citokina (IL-10 i TGF- β) na sistemskom nivou. Direktna primena izolovanih antigena pokreće ekspanziju Treg ćelija, ali nekonvencionalnog CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ fenotipa na periferiji i na nivou ciljnih organa.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Iako su brojne studije analizirale uticaj infekcije helmintima na modulaciju eksperimentalnih modela autoimunskih bolesti, samo nekoliko njih je analiziralo uticaj izolovanih ekskretorno-sekretornih produkata helminata umesto primene živih parazita. Generalno je pokazano da infekcija helmintima kao i primena njihovih produkata dovode do polarizacije imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa. Ipak u literaturi je malo podataka o mehanizmima koji se nalaze u osnovi takve imunomodulacije

autoimunskih bolesti. U ovoj disertaciji smo pokazali da tretman produktima *T. spiralis*, bilo putem *in vitro* uticaja na sazrevanje DC ili direktnom aplikacijom eksperimentalnim životinjama, daje sličan efekat inhibicije toka EAE-a kao sama infekcija, pri čemu je uočena razlika na nivou aktivacije T regulatornih limfocita. Poznato je da indukcija Foxp3⁺ Treg ćelija predstavlja jedan od mehanizama kojima tolerogene DC kontrolišu autoreaktivne T-limfocite. Na značaj Treg ćelija kao i povišenih nivoa citokina IL-10 i TGF- β , u supresiji autoimunskih bolesti ukazale su brojne eksperimentalne studije. I naši rezultati pokazuju da Treg limfociti mogu biti uključeni u kontrolu, kako Th2 odgovora na parazitsku infekciju, tako i Th1 i Th17 odgovora odgovornih za nastanak EAE-a. Iako su eksperimentalne studije pokazale ublažavanje simptoma bolesti samo pri primenama malih doza tolerogenih DC, u našim nalazima najveća primenjena doza od 5×10^6 DC/ES L1 imala je najjači uticaj na ublažavanje simptoma EAE-a. Profilaktička primena ES L1 antigena parazita *T. spiralis* imala je kapacitet da menja tok EAE-a putem preusmeravanja imunskog odgovora u pravcu Th2 na periferiji i u CNS-u, kao i putem aktivacije Treg ćelija. Aplikacija ES L1 antigena dovela je do pojave nekonvencionalnih CD4⁺CD25⁻ Foxp3⁺ Treg ćelija, koje su bile prisutne u visokom procentu i na periferiji i u centralnom nervnom sistemu tretiranih životinja. Supresija Th1/Th17 odgovora zapažena u tretmanu ES L1 antigenima može biti posledica pojačanog Th2 i anti-inflamatornog odgovora tj. povećane produkcije IL-4 i IL-10, jer je poznato da su citokini IL-4 i IL-10 medijatori koji mogu da spreče proliferaciju Th1 limfocita i produkciju pro-inflamatornih citokina. Rezultati dobijeni u ovom radu profilaktičkom primenom ES L1 antigena parazita *T. spiralis* koreliraju sa rezultatima autora koji su koristili totalni solubilni ekstrakt *T. spiralis* u modulaciji toka EAE-a kao i eksperimentalnog kolitisa. Ispitivanja sprovedena u ovom radu po prvi put su pokazala da aplikacija ES L1 antigena DA pacovima pre indukcije EAE-a dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti nekonvencionalnih CD4⁺CD25⁻ Foxp3⁺ T- ćelija i na sistemskom i na lokalnom nivou. Ovakav efekat u modulaciji EAE-a pomoću parazita *T. spiralis* do sada je zapažen samo u tretmanu sa ES L1 antigenima dok aplikacija dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima, kao i infekcija mišim larvama parazita ne izazivaju ekspanziju Foxp3⁺ populacije ćelija koja ne eksprimira CD25. Različite eksperimentalne studije su potvrdile da pored CD25⁺ T- ćelija, imunosupresivno

dejstvo u *in vitro* i *in vivo* uslovima imaju i CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T- elije. Njihova regulatorna funkcija pokazana je i u studiji o protektivnom efektu ovih elija na nastanak dijabetesa, EAE-a i inflamatorne bolesti creva. Na osnovu naših, i rezultata drugih autora, može se zaključiti da populacija ovih elija doprinosi modulaciji EAE-a koja se postiže primenom metaboličkih produkata miši njih larvi *T. spiralis*. Imaju i u vidu da samo tretman sa ES L1 antigenima indukuje ekspanziju CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T- elija može se pretpostaviti da profilaktička promena ovih antigena doprinosi supresiji bolesti upravo putem aktivacije Foxp3⁺ Treg elija ovog fenotipa, uz pokretanje Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radović I, Gruden-Movsesijan A, Ilić N, Cvetković J, Mojsilović S, Dević M, Sofronić-Milosavljević L. 2015. Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunologic Research* 61: 312-325.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis***“ dr Ivane Mitić predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju mehanizama kojima helminti modifikuju imunski odgovor tokom autoimunskih i drugih inflamatornih poremećaja što bi moglo da otvori mogućnost za njihovu dalju primenu u kliničkim studijama i eventualno terapiji multiple skleroze i drugih inflamatornih bolesti. U ovom radu po prvi put je pokazano da ne samo infekcija parazitom *T. spiralis* već i tretman njenim produktima, odnosno ES L1 antigenima, daje sličan efekat inhibicije toka autoimunske bolesti. Taj inhibični efekat je ostvaren kako indirektno, putem *in vitro* uticaja ES L1 antigena na sazrevanje DC koji su potom davane životinjama, tako i direktnom aplikacijom tih antigena životinjama pre indukcije EAE-a, pri čemu su uočene

određene razlike u mehanizmima inhibicije koje su se ogledale pre svega na nivou aktivacije T-limfocita kojima se pripisuju regulatorna svojstva.

Ova doktorska disertacija je urađena uz poštovanje svih principa naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledni i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

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

U Beogradu, 24.05.2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dušan Popadi

Dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević

Prof. dr Dragana Vučković

Mentor: Prof. dr Miloš Marković

Komentor: Dr Nataša Ilić
