

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 26.11.2018. godine, odlukom broj 9700/01 imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom**” kandidatkinje dr Irene Vuković Petrović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Vladimir Trajković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu**
2. **Prof. dr Vera Pravica, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu**
3. **Akademik prof. dr Miodrag Čolić, profesor emeritus Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije**

Mentor ove doktorske disertacije je **prof. dr Jelena Drulović**, a komentori **doc. dr Emina Milošević i n. saradnik dr Verica Paunović**.

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorkom, komentorkama i kandidatkinjom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije:

Doktorska disertacija „**Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom**” je napisana na 53 strane (bez literature) i podeljena je u sedam poglavlja: Uvod (15 strana), Ciljevi (2 strane), Materijal i metode (9 strana), Rezultati (17 strana), Diskusija (8 strana),

Zaključci (2 strane), Literatura (13 strana). Disertacija sadrži 14 slika i 5 tabela. Ona takođe sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skraćenica, biografiju autora i priloge.

U poglavlju **UVOD**, opisani su epidemiološki, klinički i etiopatogenetski aspekti multiple skleroze (MS), definisan proces i faze autofagije kao i uloga autofagije u imunskom odgovoru. Ukratko je dat pregled poznatih etioloških činilaca sa posebnim osvrtom na ulogu T- i B-limfocita u imunopatogenezi MS. Opisani su imunološki mehanizmi koji dovode do oštećenja tkiva centralnog nervnog sistema (CNS), pri čemu je dat poseban akcenat ulogi proinflamatornih citokina (TNF, IFN- γ , IL-17 i GM-CSF). U daljem izlaganju, prikazana je uloga proteina značajnih u formiranju autofagozoma (ATG13, ULK1), nukleaciji (ATG14, BECN1, PIK3C3) i elongaciji vezikule (ATG3, ATG4B, ATG5, ATG7, ATG10, GABARAP), obeležavanju proteina za degradaciju u autofagolizozomima (SQSTM1), transkripcionoj aktivaciji (ATF4, FOXO1, FOXO3) i regulaciji autofagije (BCL2, BNIP3). Među genima koji regulišu autofagiju posebno je izdvojen značaj ATG5 u homeostazi T- i B-limfocita. Prikazane su i pretpostavljene uloge autofagije u imunopatogenezi multiple skleroze, kao i dosadašnji rezultati istraživanja na tom polju.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani i iskazani su kroz tri cilja: 1) utvrditi nivoe ekspresije gena koji regulišu autofagiju (*ATG7, ATG10, ATG5, ATG4B, ATG3, ATG13, ATG8A, ATG14, SQSTM1, BCL2, ULK1, BNIP3, FOXO1, FOXO3, VPS34, BECN1, ATF4*) i proinflamatornih citokina (*TNF, IFN- γ , IL-17* i *GM-CSF*) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNC $\dot{P}K$) i njihovim subpopulacijama ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD4^-$ i $CD3^-CD19^+$) pacijenata sa multiplom sklerozom i zdravih kontrola, 2) utvrditi nivoe ekspresije proteina karakterističnih za autofagiju (LC3, SQSTM1) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i njihovim subpopulacijama pacijenata sa multiplom sklerozom i zdravih kontrola, 3) utvrditi da li postoji povezanost između nivoa ekspresije ispitivanih gena i proteina sa demografskim parametarima pacijenata i kliničkim pokazateljima težine bolesti.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** metodološki jasno i precizno su definisani kriterijumi za selekciju ispitanika, postavljanje dijagnoze multiple skleroze i izbor kontrolne grupe. Takođe, detaljno i jasno su opisane metode izolacije mononuklearnih ćelija periferne krvi i sortiranja ćelija, određivanje genske ekspresije reakcijom lančanog umnožavanja DNK u realnom vremenu (Real time PCR) i ekspresije proteina karakterističnih za autofagiju Western blot metodom. Studija je izvedena u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije i

odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Takođe je opisana i metodologija korišćena u statističkoj analizi podataka.

U poglavlju **REZULTATI** kroz sistematične celine detaljno su opisani i jasno predstavljeni rezultati istraživanja:

- rezultati ispitivanja ekspresije iRNK proteina značajnih u regulaciji autofagije (*ATG7, ATG10, ATG5, ATG4B, ATG3, ATG13, ATG8A, ATG14, SQSTM1, BCL2, ULK1, BNIP3, FOXO1, FOXO3, VPS34, BECN1, ATF4*) u MNČPK i različitim subpopulacijama limfocita ($CD3^+CD4^+$ T, $CD3^+CD4^-$ T i $CD3^-CD19^+$ B-limfocita) pacijenata sa MS i zdravih kontrola
- rezultati analize ekspresije ATG5 na nivou proteina, kao i stepena aktivnosti bazalne autofagije u MNČPK i $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima pacijenata sa MS i kontrola
- rezultati ispitivanja korelacije između nivoa ATG5 iRNK u $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima sa ekspresijom proinflamatornih citokina značajnih u patogenezi MS i pojavom onesposobljenosti kao posledice bolesti (izražena kroz EDSS skor)
- rezultati ispitivanja korelacije između nivoa TNF iRNK u $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima obolelih od MS sa EDSS skorom

Dobijeni rezultati su prikazani na 11 slika i 3 tabele.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidatkinja je na sveobuhvatan i detaljan način povezala rezultate ovog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. Na osnovu toga, kandidatkinja je iznela svoje zaključke i hipoteze koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u kontekstu rezultata drugih autora koji imaju isti naučni interes. Takođe je ukazala na moguće smernice budućih istraživanja u cilju daljeg razjašnjavanja značaja ispitivanih gena i proteina u patogenezi MS.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najznačajniji zaključci koji su u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja i dobijenim rezultatima.

Korišćena **LITERATURA** sadrži spisak od 192 reference.

B. Kratak opis najvažnijih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ispitivanih gena i proteina u MNČPK pacijenata sa MS i zdravih kontrola. Istaknuto je da postoji povišena ekspresija *ATG5* u T-limfocitima obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama, dok razlika u ekspresiji ostalih gena između dve grupe ispitanika nije uočena. Nasuprot tome, ekspresija iRNK za *ATG5* u $CD3^+CD19^+$ B-limfocitima MS pacijenata bila je nešto niža u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika. Takođe, detektovani su povišeni nivoi *ATG5* proteina u $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima, ali ne i u MNČPK obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama. Uočena povišena ekspresija *ATG5* proteina u $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima pacijenata sa MS nije bila povezana sa indukcijom autofagije u ovim ćelijama. U ovoj studiji pronađena je povezanost između ekspresije iRNK za *ATG5* i *TNF* u $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima MS pacijenata. Međutim, nije uočena korelacija između kliničkih pokazatelja stepena onesposobljenosti sa ekspresijom iRNK za *ATG5* i *TNF* u $CD3^+CD4^+$ T-limfocitima obolelih od MS.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Iako je značaj autofagije i proteina koji regulišu autofagiju ispitivan u različitim aspektima urođene i adaptivne imunosti, njihova uloga u patogenezi MS je bila predmet istraživanja malog broja studija. Nedavno objavljeni rezultati studije Igci i sar. (Igci, M., et al., *Gene*, 2016. 588(1): p. 38-46.) ukazuju na različitu ekspresiju nekoliko regulatora autofagije, uključujući *ULK1*, *BCL2* i *FOXO1* koji su ispitivani u ovoj disertaciji, u MNČPK MS pacijenata i kontrola. Međutim, u ovoj disertaciji nije uočena razlika u ekspresiji pomenutih gena, ni na nivou MNČPK, ni u sortiranim populacijama ćelija. Postojeće neslaganje u rezultatima je pripisano razlikama u odabiru ispitanika. Naime, oboleli od MS u ovoj disertaciji nisu bili uključeni u imunosupresivni/imunomodulatorni terapijski protokol i analiziran je manji broj ispitanika. U ovoj disertaciji selektivno povećana ekspresija *ATG5* iRNK ($CD4^+$ i $CD8^+$ T-limfociti) i proteina ($CD4^+$ T-limfociti) u skladu je sa detektovanom povišenom ekspresijom *ATG5* u T-limfocitima sa periferije i u CNS pacijenata sa aktivnom formom bolesti prikazanom u literaturi (Alirezaei, M., et al., *Autophagy*, 2009. 5(2): p. 152-8.). Pored toga, imajući u vidu da postoji sve više podataka o ulogama ATG proteina koje nisu direktno povezane sa procesom autofagije, nije iznenađujuće da je i u ovoj studiji

povišena ekspresija ATG5 nezavisna od indukcije autofagije u T-limfocitima. Tumačenje uočene korelacije između ekspresije iRNK za ATG5 i TNF u CD3⁺CD4⁺ T- limfocitima MS pacijenata je dodatno otežano usled kontradiktornih uloga TNF u patogenezi MS.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

Paunovic V[#], Petrovic IV[#], Milenkovic M, Janjetovic K, Pravica V, Dujmovic I, Milosevic E, Martinovic V, Mesaros S, Drulovic J, Trajkovic V. Autophagy-independent increase of ATG5 expression in T cells of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2018 Jun 15;319:100-105. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.03.001. Kategorija časopisa M22, IF 2,655.

equally contributing authors

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u ispitivanju ekspresije gena i proteina koji regulišu autofagiju (*ATG7, ATG10, ATG5, ATG4B, ATG3, ATG13, ATG8A, ATG14, SQSTM1, BCL2, ULK1, BNIP3, FOXO1, FOXO3, VPS34, BECN1, ATF4*) i proinflamatornih citokina (*TNF, IFN- γ , IL-17* i *GM-CSF*) u MNČPK i različitim subpopulacijama limfocita pacijenata sa MS i zdravih kontrola, sa ciljem boljeg razumevanja njihove uloge u imunopatogenezi bolesti. Naime, po prvi put u Srbiji je utvrđena povišena ekspresija ATG5, nezavisna od indukcije autofagije, u T-limfocitima obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama. Pored toga, u ovoj studiji je po prvi put uočena pozitivna korelacija između ATG5 i TNF u T-limfocitima pacijenata sa MS. Neophodna su detaljnija istraživanja kako bi se utvrdila potencijalna uloga ATG5 u T-limfocitima u patogenezi MS i da li monitoring/modulacija ATG5 ima dijagnostički/terapijski potencijal u ovoj bolesti. Na budućim studijama sa većim brojem ispitanika u našoj i drugim populacijama je da procene stvarni značaj i klinički potencijal nalaza ove doktorske disertacije.

F. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „**Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom**” kandidatkinje dr Irene Vuković Petrović urađena je 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, sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom**” kandidatkinje dr Irene Vuković Petrović, i odobri javnu odbranu.

Mentor:

Prof. dr Jelena Drulović

Komentori:

Doc. dr Emina Milošević

N. saradnik Verica Paunović

Članovi Komisije

Prof. dr Vladimir Trajković

Prof. dr Vera Pravica

Akademik prof. dr Miodrag Čolić