

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20. 05. 2021. godine, broj 9700/14-DV, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Dejstva makrofagnog migratornog inhibitornog faktora i betaina na morfofunkcionalne, ćelijske i tkivne promene u fibrozi jetre: epidemiološki značaj hronične bolesti jetre“

kandidata dr Dušana Vukićevića, zaposlenog u Univerzitetskoj klinici Mannheim u Nemačkoj. Mentor je redovni prof. dr Tatjana Radosavljević, a komentor vanredni prof. dr Nataša Maksimović

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Danijela Vučević**, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. **Prof. dr Tatjana Pekmezović**, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. **Prof. dr Kristina Gopčević**, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. **Prof. dr Janko Samardžić**, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
5. **Prof. dr Snežana Živančević Simonović**, profesor Univerziteta za medicinske nauke u Kragujevcu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Dušana Vukićevića napisana je na ukupno 107 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 3 tabele i 32 slike koje su prema pripadnosti rezultatima koje prikazuju grupisane u 14 celina. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i tri priloga (Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju).

U **Uvodu** je prvi odeljak posvećen epidemiologiju hroničnih bolesti jetre (CLDs). Incidencija i prevalencija CLDs je veoma visoka u celom svetu. Od ukupno 2 miliona smrtnih slučajeva godišnje od CLDs u svetu, oko 45% svih smrtnih slučajeva uzrokovano je fibrozom jetre. U sledećem odeljku detaljno je opisana patogeneza fibroze jetre. Fibrogeneza jetre je dinamičan i reverzibilan proces, koji uključuje molekularne, ćelijske i tkivne promene odgovorne za akumulaciju i remodelovanje ekstraćelijskog matriksa (ECM). Oksidativni stres, inflamacija i aktivacija hepatičnih zvezdastih ćelija (HSC) koje sintetišu kolagen, faktor rasta poreklom iz trombocita (PDGF), matriks metaloproteinaze (MMPs) i tkivne inhibitore matriks metaloproteinaza (TIMPs), kao i druge proteine ECM, imaju ključnu ulogu u fibrogenezi jetre. Transformišući faktor rasta- β 1 (TGF- β 1) i PDGF su najvažniji profibrogeni medijatori u jetri. U trećem odeljku pažnja je posvećena multipotentnom citokinu, makrofagnom migratornom inhibitornom faktoru (MIF-u), receptorima za MIF, kao i njegovoj ulozi u raznim bolestima, sa posebnim osvrtom na ulogu MIF-a u bolestima jetre, koja još uvek nije dovoljno istražena. U narednom odeljku opisani su animalni modeli fibroze jetre. Zbog velike prevalencije hroničnih oboljenja jetre širom sveta, animalni modeli su presudni za dalje razjašnjavanje molekularnih mehanizama fibrogeneze jetre, otkrivanje terapijskih ciljeva i razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih modaliteta za ispitivanje novih lekova. Navedeno je nekoliko animalnih modela fibroze jetre: hemijski-, dijetom-, hirurški- i genetski- indukovana fibroza jetre. Detaljno je opisan eksperimentalni model fibroze jetre izazvan tioacetamidom (TAA) koji je korišćen u ovoj disertaciji. U završnom odeljku uvoda detaljno je opisana hepatoprotektivna uloga betaina u bolestima jetre. Međutim, precizni antioksidativni, antiinflamatorni i antifibrotični efekti betaina na MIF u razvoju fibroze jetre i srodni mehanizmi nisu ispitani.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od: ispitivanja uticaja MIF-a na funkcionalne promene jetre kod ispitivanih miševa; ispitivanje efekata MIF-a na oksidativni stres, inflamaciju i fibrogenezu u jetri, zatim na morfološke promene jetre, matriks metaloproteinaze-2 i -9 (MMP-2 i -9), tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza-1 (TIMP-1) i dimer MMP-9, kao i ispitivanje modulatornog uticaja betaina na MIF-posredovanu fibrozu jetre. Takođe, cilj ove disertacije je proceniti epidemiološki značaj hroničnih bolesti jetre.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o eksperimentalnoj studiji čije su procedure u potpunosti u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta i Saveta (2010 / 63EU) i odobrena od strane Etičkog odbora za rad sa životinjama Univerziteta u Beogradu (dozvola br. 6600/2). Eksperiment je izveden na mužjacima miševa divljeg soja C57BL/6 i na miševima kojima je uklonjen gen za MIF (MIF^{-/-} knockout C57BL/6 mice) starosti 8 nedelja, težine 21-

25g, podeljeni u sledeće grupe po 10 životinja (n = 10): 1. Kontrolna grupa; 2. Bet-grupa (životinje su dobijale betain u vodi za piće); 3. MIF^{-/-} grupa miševa kojima je uklonjen gen za MIF; 4. MIF^{-/-}+Bet grupa (MIF^{-/-} miševi su dobijali betain u vodi za piće); 5. TAA grupa (životinje su tretirane tioacetamidom; 6. TAA+Bet grupa (miševa divljeg tipa tretirani tioacetamidom uz suplementaciju betainom u vodi za piće); 7. MIF^{-/-}+TAA grupa (MIF^{-/-} miševi tretirani sa TAA; 8. MIF^{-/-}+TAA+Bet grupa (MIF^{-/-} miševa koji su tretirani TAA uz suplementaciju betainom u vodi za piće). Fibroza jetre je izazvana TAA (200 mg/kg) rastvorenim u 200μL PBS (Phosphate Buffered Saline) intraperitonealno (i.p.) tri puta nedeljno u periodu od 8 nedelja. Betain je rastvoren u vodi za piće (2% wt/v) i životinje su imale slobodan pristup vodi *ad libitum*. Posle tretmana, životinje su žrtvovane iskrvarenjem u ketaminskoj anesteziji i za analizu su uzeti uzorci krvi i jetre. U serumu su određivani sledeći parametri: alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (ALP), γ-glutamyl-transferaza (γ-GT), ukupni bilirubin, albumini i C-reaktivni protein (CRP). U tkivu jetre određivani su: parametri oksidativnog stresa- malondialdehid (MDA), oksidacioni produkti proteina (advanced oxidation protein products, AOPP), aktivnost ukupne superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT), ukupna količina tiola, ukupni antioksidativni status (TAS) i ukupni oksidativni status (TOS); markeri zapaljenja - interleukin-6 (IL-6) i interferon-γ (IFN-γ); markeri fibroze-transformišući faktor rasta-beta1 (TGF-β1) i faktor rasta oslobođen iz trombocita (platelet derived growth factor, PDGF-BB), matriks metaloproteinaze-2 i -9 (MMPs), dimer MMP-9 i tkivni inhibitor matriks metaloproteinaze-1 (TIMP-1). Spektrofotometrija, ELISA, SDS-PAGE zimografija i reverzna elektroforetska zimografija su metode korišćene u ovom istraživanju, kao i histološka analiza tkiva jetre sa kvantifikacijom stepena fibroze.

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

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka iz 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 309 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere autentičnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je verifikovana autentičnost doktorske disertacije „Dejstva makrofagnog migratornog inhibitornog faktora i betaina na morfofunkcionalne, ćelijske i tkivne promene u fibrozi jetre: epidemiološki

značaj hronične bolesti jetre“, autora Dušana Vukićevića, zaključeno je da je utvrđena podudarnost teksta 25%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je teksta u poglavlju Materijal i Metode, u statističoj analizi i značajnosti, opštih mesta i podataka, teksta u poglavlju Rezultati, nazivi podpoglavlja u Sadržaju i u doktoratu, kao i podudarnost u delu Skraćenice, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

TAA u MIF deficijentnih (MIF^{-/-}) miševa izazvao je manju redukciju telesne težine i odnosa težina jetre/telesna težina u odnosu na divlji soj (TAA grupu). Dalje, kod MIF^{-/-} miševa tretiranih TAA, aktivnost ALT i AST, kao i koncentracija bilirubina bila je značajno niža u poređenju sa TAA grupom (p<0.01). U poređenju sa TAA grupom, uočeno je i značajno sniženje markera lipidne proksidacije i oksidativnog stresa, MDA, AOPP (p<0.01) i TOS (p<0.05), a povećanje antioksidativne zaštite, tiola i TAS (p<0.01). Takođe, koncentracija CRP u krvi, kao i nivo IL-6 i IFN- γ u tkivu jetre MIF^{-/-} miševa su bili značajno sniženi u poređenju sa divljim sojem miševa tretiranih TAA (p<0.01). Ovakvi rezultati ukazuju na oksidativno i proinflatorno dejstvo MIF-a. S druge strane, koncentracija profibrogenih medijatora (TGF- β 1 i PDGF-BB), kao i aktivnost MMP-2 and -9, dimer MMP-9 i TIMP-1 su bili su značajno viši u MIF deficijentnih miševa u poređenju sa divljim sojem (TAA grupa) (p<0.01). Dalje, histološkom analizom tkiva jetre uočena je izrazito nepravilna struktura jetre sa mešovitim inflamatornim infiltratom. Izražena premošćujuća (bridging) fibroza i mikronodularna ciroza jetre je bila prisutna kod MIF^{-/-} miševa u odnosu na divlji soj (TAA grupu). Histološko Masson's trichrome i retikulin bojenje je pokazalo izraženu fibrozu (povećanje Coll1 i Coll3). Osam nedelja nakon administracije TAA, fibrozni skor je bio značajno veći u jetri miševa sa nedostatkom MIF u poređenju sa divljim sojem miševa (p<0.01). Poređenjem histopatološkog nalaza tkiva jetre MIF^{-/-} miševa, koncentracije profibrogenih medijatora (TGF- β 1 i PDGF-BB), kao i aktivnosti MMP-2 and -9, dimer MMP-9 i TIMP-1, sa miševima divljeg soja se indirekto ukazuje na antifibrogeno dejstvo MIF.

Suplementacija betainom miševa TAA grupe u trajanju od 6 nedelja smanjila je oštećenje hepatocita izazvano TAA s obzirom da je aktivnost ALT, AST, γ GT i koncentracija bilirubina bila značajno niža u odnosu na životinje koje nisu dobijale betain (p<0.01). Slično ovim nalazima, u poređenju sa TAA grupom, suplementacija betainom redukovala je oksidativno oštećenje jetre izazvano TAA, smanjenjem lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa, MDA i

AOPP ($p < 0.01$), kao smanjenjem TOS ($p < 0.05$). S druge strane, u TAA+Bet grupi u poređenju sa TAA grupom u jetri je dokazano značajno povećanje aktivnosti SOD, CAT, TAS ($p < 0.01$) i koncentracije tiola ($p < 0.01$). Pored antioksidativnog dejstva, betain je pokazao i antiinflamatorno dejstvo smanjenjem koncentracije CRP, IL-6 i INF- γ , kao i antifibrogeno, smanjenjem koncentracije profibrogenih medijatora (TGF- β 1 i PDGF-BB), kao i aktivnosti MMP-2 and -9, dimer MMP-9 i TIMP-1 u poređenju sa TAA grupom ($p < 0.01$). Suplementacija betainom miševa TAA grupe poboljšala je histološki nalaz tkiva jetre i smanjila oštećenje hepatocita. Histološka struktura jetre bila je manje nepravilna sa oskudnom fibrozom i blagim inflamatornim infiltratom. Kvantifikacijom fibroze (Masson i retikulin bojenje) dobijen je značajno manji fibrozni skor, odnosno manje Coll1 i Coll3 u poređenju sa TAA grupom ($p < 0.01$). Betain modulira prooksidativno dejstvo MIF smanjenjem MDA i TOS, a povećanjem koncentracije tiola u fibrozi jetre izazvane TAA. Takođe, betain modulira i proinflamatorno dejstvo MIF smanjenjem CRP, IL-6 i IFN- γ .

Suplementacija betainom MIF^{-/-} miševa značajno je redukovala aktivnost ALT i AST u poređenju sa MIF^{-/+}TAA i TAA+Bet grupom ($p < 0.01$). Takođe, kod istih životinja betain je smanjio aktivnost γ GT u poređenju sa MIF^{-/+}TAA grupom i koncentraciju bilirubina u odnosu na TAA+Bet ($p < 0.01$). Osim ovog, betain je kod MIF^{-/-} miševa značajno smanjio MDA i TOS u poređenju sa MIF^{-/+}TAA i TAA+Bet grupom ($p < 0.01$). Takođe, betain je smanjio oksidaciju proteina čiji je parametar AOPP u odnosu na TAA+Bet grupom ($p < 0.01$). Suplementacija betainom MIF^{-/-} miševa ne samo da je dovela do smanjenja oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije, već i do povećanja antioksidativne zaštite značajnim povećanjem aktivnosti ukupne SOD i katalaze kao i povećanje TAS u poređenju sa MIF^{-/+}TAA grupom ($p < 0.05$; $p < 0.01$). Međutim, nakon suplementacije betainom MIF^{-/-} miševa ostale su nepravilne histološke strukture tkiva jetre sa blagom fibrozom i mešovitim inflamatornim infiltratom. Betain je smanjio taloženje ECM (smanjenje fibroznog skora) u poređenju sa MIF^{-/+}TAA grupom ($p < 0.01$), međutim u odnosu na TAA+Bet grupu taj skor je bio značajno viši ($p < 0.01$).

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Eksperimentalni modeli fibroze jetre su neophodni da bi se bolje razumela uloga MIF-a u interakciji između hronične inflamacije jetre i oksidativnog stresa, fibroze i remodelovanja ECM kod hroničnih nezaraznih bolesti jetre i može otvoriti put ka novim strategijama u prevenciji i lečenju. Dalje ispitivanje uloge MIF-a kako u jetri (Wirtz TH, 2020) tako i u neurodegenerativnim bolestima (Basile MS, et al. 2020) je od velike važnosti za pronalaženje ciljne dijagnoze i terapije

MIF-om. Tako, nedavna istraživanja pokazuju da pacijenti sa visokim nivoom MIF-a i niskim nivoom njegovog CD74 receptora u krvi imaju povećani rizik od smrtnosti kod pacijenata sa dekompenzovanom cirozom jetre (Wirtz TH, 2020). Uloga MIF-a u jetri zavisi od etiologije, stadijuma bolesti, specifičnog obrasca ekspresije intrahepatičnih receptora za MIF i složenosti MIF signala (Marin V, et al. 2017; Jankauskasa SS, et al. 2019; Heinrichs D, et al. 2021).

U eksperimentalnoj fibrozi jetre izazvanoj TAA, MIF doprinosi povećanju aktivnosti ALT i AST, ukupnog nivoa bilirubina u serumu, a takođe uzrokuje lipidnu peroksidaciju i oksidaciju proteina, što ukazuje na značaj MIF-a u hepatotoksičnim i prooksidativnim efektima TAA. Štaviše, prooksidativni efekat MIF-a u oštećenju jetre izazvane TAA može se delimično objasniti smanjenjem tiola u jetri, bez promena u aktivnosti SOD i CAT. S druge strane, rezultati nekih studija pokazuju antioksidativni potencijal MIF-a (Miller EJ, et al. 2008; Stoppe C, et al. 2017; Hu Y, 2018). Mehanizmi antioksidativne uloge MIF-a mogu biti različiti u zavisnosti od njegovog redoks stanja, signalnih puteva povezanih sa receptorima i samog organa. MIF igra glavnu ulogu u zaštiti srca i bubrega od ishemijsko/reperfuzione povrede (Stoppe C, 2017; Li JH, et al. 2019) zbog katalitičke aktivnosti tiol oksidoreduktaze (Nguyen MT, et al. 2003), povećanja odnosa redukovanog i oksidisanog glutaciona, smanjenja oksidacije proteina i poboljšanja funkcije mitohondrija u kardiomiocitima (Riad A, et al. 2008). Yukitake i sar. (2017) su pokazali da MIF, kao regulator transkripcije gena posredovanih elementima antioksidativnog odgovora (ARE), indukuje ekspresiju brojnih antioksidativnih enzima. Prema tome, regulacija redoks homeostaze preko MIF/ARE osovine može biti moguća meta u terapiji mnogih bolesti koje u svojoj patogenezi imaju oksidativni stres. Međutim, MIF u hepatotoksičnosti izazvanoj TAA, ispoljava prooksidativni efekat. Njegov mehanizam u antioksidativnom sistemu nije jasan, pa ova MIF/ARE osovina ne može biti univerzalna terapijska meta kod oksidativnog oštećenja organa. Rezultati ove studije su pokazali da dodatak betaina zaštitno deluje na jetru smanjenjem koncentracije MDA, AOPP i TOS kod životinja tretiranih TAA, kao i povećanjem antioksidativne aktivnosti SOD, CAT, nivo tiol grupa i TAS-a. Betain smanjuje MIF-posredovanu peroksidaciju lipida i povećava antioksidativni kapacitet. Ovi nalazi pokazuju da betain inhibira oksidativne puteve MIF-a, detoksifikacijom ROS-a koji nastaju kao posledica metabolizma TAA u jetri. Betain inhibira aktivnost NF- κ B i samim tim povezanost stresa i inflamacije (Zhao G, et al. 2018). Dalje, betain smanjuje stvaranje endogenih molekularnih molekula povezanih sa oštećenjem (damage-associated molecular patterns, DAMPs), čime inhibira transkripcioni faktor, NF- κ B. Povećana intraćelijska koncentracija MIF-a deluje kao DAMP i indukuje stvaranje ROS-a, dovodi do stresa ER i inhibira apoptozu indukovanu

aktivacijom p53 (Zhang M, et al. 2016). Betain ispoljava antioksidativne i antiinflamatorne efekte, ublažavajući stres ER, apoptozu (Zhao G, 2018) i smanjujući peroksidaciju lipida (Söğüt I, et al. 2016). Pored smanjenja oksidacije proteina, betain povećava antioksidativnu aktivnost SOD, CAT i TAS, putem mehanizama koji ne uključuju MIF, kao što je kontrola metabolizma amino kiselina koje sadrže sumpor (SAA) (Ge CX, et al. 2016, Zhang M, et al. 2016) i indukcija sinteze S-adenozil metionina (SAM) u hepatocitima, što je bitno u obnavljanju biomembrana (Jacobs RL, et al. 2013; Zhang M, et al. 2016). Rezultati Okada i sar. (2011) su pokazali da tretman od 1% betaina ima antioksidativno dejstvo, jer dovodi do povećanja GSH i srodnih enzima u hepatotoksičnosti izazvane D-galaktozaminom. Oštećena sinteza GSH odgovorna je za izmenjenu redoks homeostazu u mnogim bolestima jetre, uključujući ALD, NAFLD, oštećenje jetre izazvano lekovima, kao i fibrozu jetre (Yang H, et al. 2010; Ramani K, et al. 2012; Chen Y, et al. 2013). Antioksidativno dejstvo betain ostvaruje inhibicijom produkcije ROS-a i aktivnosti NF-kB, održavanjem nivoa tiola, posebno GSH, difuzijom kroz lipidnu dvoslojnu membranu u ćelije (Kanbak G, et al. 2001), povećanjem aktivnosti CAT (Zhang M, et al. 2016), zaštitom funkcije mitohondrija (Heidari R, et al. 2018) i deluje kao osmoprotektant (Lever M, et al. 2010).

Pored prooksidativnog dejstva, utvrđeno je da MIF doprinosi povećanju koncentracije CRP, IL-6 i IFN- γ , što ukazuje na proinflamatornu ulogu MIF-a. Veza između ROS-a, MIF-a i inflamacije može se objasniti aktivacijom NF-kB od strane ROS-s. Aktivirani NF-kB je glavni faktor transkripcije koji povećava proizvodnju IL-1 β , IL-6, TNF- α , hemokina, faktora rasta, ciklooksigenaze-2, CRP i drugih medijatora (Ping Z, et al. 2020). Slično našim rezultatima, druge studije su takođe pokazale proinflamatorni efekat MIF posredovan oksidativnim stresom (Kozaci LD, et al. 2010; Park MC, et al. 2021). Rezultati naše studije pokazali su da je MIF izazvao značajan porast koncentracije IFN- γ kod miševa tretiranih TAA u jetri. Vang i sar. (2017) su pokazali povećani nivo IFN- γ kod pacijenata sa fibrozom jetre. IFN- γ je proinflamatorni citokin koji doprinosi urođenom i adaptivnom imunitetu. MIF kontra-reguliše inhibitorne efekte glukokortikoida, povećava proizvodnju IFN- γ i tako kontroliše imunitet i inflamaciju (Calandra T, et al. 2017). MIF je multipotentni inflamatorni citokin, koji doprinosi progresiji hroničnih inflamatornih poremećaja (Hoi AY, et al. 2007; Kozaci LD, et al. 2010; Sinitski D, et al. 2019) indukcijom stresa ER i stimulacijom inflamazoma (Lang T, et al. 2018; Poulsen KL, et al. 2018, 2019). Povećana ekspresija MIF-a je dokazana kod dijabetes melitusa tipa 2 i kod miševa i kod ljudi (Sanchez-Zamora Y, 2010; Rodriguez-Sosa M, et al. 2017). MIF ispoljava inflamatorne efekte posredovane signalnim putevima MIF/CKSCR2 ili MIF/CKSCR4 (Marin V, 2017). S druge

strane, brojne studije ukazuju na antiinflamatorni efekat MIF-a koji ostvaruje preko CD74/AMPK signalnog puta, sa inhibicijom sinteze TNF- α i IL-6, kao i promenom makrofaga iz fenotipa M1 u M2 (Ju C et al. 2015; Gligorovska Lj, et al. 2019). MIF u jetri ima dvojak efekat u zavisnosti od etiologije bolesti jetre, stadijuma bolesti, promenjene ekspresije MIF i složenosti MIF signala (Jankauskasa SS, et al. 2019). Ova studija je pokazala da betain značajno smanjuje serumsku koncentraciju CRP i nivoa hepatičnih IL-6 i IFN- γ u eksperimentalnoj fibrozi jetre. Betain je redukovao inflamaciju preko MIF posredovane inhibicije ekspresije NF- κ B, aktivacijom NLRP3, inflamacijom, stresom ER, apoptozom ili putem AMPK (Zhao G, et al. 2018; Kim MJ, et al. 2017; Shin MS, et al. 2019; Poulsen KL et al. 2019). Hepatoprotektivne efekte betain ostvaruje povećanjem antioksidativne zaštite, smanjenjem inflamacije, apoptoze i stresa ER, kao i regulisanjem funkcije mitohondrija (Meng X, et al. 2018; Heidari R, et al. 2018; Zhao G, 2018).

Rezultati naše studije pokazali su da MIF ispoljava antifibrogeni efekat smanjenjem nivoa TGF- β 1 i PDGF-BB u jetri, a koji se objašnjava inhibicijom aktivacije HSC, stimulisanjem degradacije ECM i rezolucijom fibroze. Slično našim rezultatima, dokazano je da u fibrozi jetre izazvane CCl4 i TAA kod miševa sa nedostatkom MIF- ili receptora CD74, pojačana je ekspresija profibrogenih gena kao što su TIMP-1, TGF- β 1 i coll1A1 (Heinrichs i sar. 2011). Ovi rezultati sugerišu da MIF smanjuje ECM i progresiju fibroze jetre. MIF-indukovani CD74/AMPK inhibira TGF- β -indukovanu ekspresiju Coll1 (Thi L, et al. 2012). Slično ovome, u eksperimentalnoj NAFLD kod miševa, MIF ispoljava antiinflamatorno dejstvo i kroz signalni put CD74/AMPK, koji inhibira sintezu TNF- β i IL-6 (Li H, et al. 2016). Naime, pojačana fibrogeneza kod miševa sa nedostatkom MIF-a verovatno je posledica uloge MIF-a u biologiji HSC-a, ali ne i promenjene infiltracije imunih ćelija. Zbog nejasnih efekata MIF-a na fibrozu, potrebna su dalja istraživanja kako bi se rasvetlili efekti MIF preko CD74 receptora na HSC. Proinflamatorni i fibrogeni efekti MIF-a dokazani su u eksperimentalnim modelima ALD, kao i u ljudskoj populaciji, a koreliraju sa smrtnošću pacijenata od alkoholnog hepatitisa (Li S, et al. 2019; Marin V, et al. 2017). Rezultati nekih studija pokazali su da kod akutne CCl4 toksičnosti (van der Vorst, et al. 2015) i CCl4-indukovane fibroze jetre dolazi do povećanja MIF-a u jetri i povećanih koncentracija u krvi, što ukazuje na lokalni i sistemski efekat MIF-a na progresiju hronične bolesti jetre (Wen Y, et al. 2021). U NAFLD/NASH progresiji, MIF doprinosi fibrogenezi jetre zahvaljujući profibrotičnim fenotipom NKT ćelija (Heinrichs D, et al. 2021), ali ublažava fibrozu jetre izazvanu dejstvom hepatotoksina (Leyton-Jaimes MF, et al. 2018).

Regulacija odnosa MMP/TIMP je od posebnog značaja za razgradnju i remodelovanje ECM-a. Kako fibroza jetre napreduje, nivo TIMP u serumu se povećava tako da TIMP-1 stupa u interakciju sa sve tri MMP (MMP-1, 2 i 9). U prilog tome, naši rezultati su pokazali povećanu denzitometrijsku površinu MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 kod miševa sa nedostatkom MIF-a tretiranih TAA u poređenju sa miševima tretiranim divljim tipom TAA. S obzirom na to da je presudni faktor za fibrogenezu jetre ravnoteža između MMP-a i TIMP-a, nalazi naše studije pokazuju da je antifibrogena aktivnost MIF-a posledica izraženijeg smanjenja aktivnosti TIMP-a od MMP-2. Štaviše, povećana fibrogenaza kod MIF^{-/-} miševa doprinosi povećanoj relativnoj aktivnosti MMP-9. TGF- β 1 je zajedno sa PDGF-BB najvažniji profibrogeni medijator koji stimuliše sintezu Coll1 i Coll3, laminina, fibronektina i α -SMA. S druge strane, povećana ekspresija TIMP-1 i smanjena aktivnost MMPs doprinose remodelovanju ECM (Parolaa M, et al, 2019; Dhar D, et al. 2020).

Pored antioksidativnog i antiinflamatornog dejstva betaina u TAA-indukovanoj fibrozi jetre, betain smanjuje nivo TGF- β 1 i PDGF-B, kao i relativnu aktivnost MMP-2, MMP-9, dimera MMP-9 i TIMP-1 u jetru. Ova dejstva betain ostvaruje inhibicijom aktivacije i funkcije HSC. Nedavna istraživanja pokazuju da TGF- β 1 stimuliše aktivaciju HSC aktivacijom metionin adenosiltransferaze 2A (MAT2A), što dovodi do smanjenja koncentracije SAM (Wang K, et al. 2019). Betain, kao regulator hepatičnog metabolizma SAM, povećava sintezu SAM i verovatno inhibira TGF- β 1/p65/MAT2A signalni put. Dokazano je da betain reguliše metabolizam lipida i smanjuje akumulaciju TG i holesterola u ALD/NAFLD/NASH, a budući da je jedan od glavnih znakova fibrogeneze jetre akumulacija holesterola u HSC, dodatak betaina može suzbiti fibrozu jetre. Precizniji efekti i mehanizmi betaina na inhibiciju fibrogeneze jetre još uvek nisu dovoljno jasni. Davanje betaina miševima sa nedostatkom MIF-a tretiranim TAA rezultira oslabljenim antifibrogenim odgovorom na hepatičke nivoe TGF- β 1 i PDGF-BB, kao i relativne aktivnosti MMP-2, MMP-9 i TIMP-1. Ovi nalazi se mogu objasniti nedostatkom antifibrogenog delovanja MIF-a. Međutim, dodatak betaina MIF^{-/-} miševima nije promenio aktivnost dimera MMP-9, što ukazuje da betain ne posreduje antifibrogeni efekat MIF-a preko dimera MMP-9. Ovakvo ponašanje MIF-a u eksperimentalnoj fibrozi jetre može se objasniti različitim mehanizmima, signalnim putevima i receptorima kroz koje ovaj pleiotropni citokin deluje. Nakon suplementacije betaina, MIF^{-/-} miševi su imali nepravilnu histološku strukturu tkiva jetre sa porto-porto fibrozom i mešovitim inflamatornim infiltratom. Naše istraživanje je pokazalo da u hepatičnoj fibrogenazi indukovanoj TAA, MIF vrši prooksidativne, proinflamatorne i

antifibrogene efekte. Slično našim rezultatima, Heiners i sar. (2011) su pokazali da kod fibroze jetre indukovane TAA- i CCl₄, MIF ispoljava antifibrogene efekte koji se ostvaruju preko CD74 receptora na HSC. S druge strane, nedavna istraživanja pokazuju da MIF pokazuje profibrogenu aktivnost u NASH (Heinrichs D, et al. 2021).

Ovo je prva studija koja pokazuje da betain modulira prooksidativne, proinflamatorne i antifibrogene efekte MIF-a u TAA-indukovanoj fibrozi jetre. Betain ublažava prooksidativne efekte MIF-a smanjenjem MDA i AOPP, kao i povećanjem tiola i TAS u jetri. Takođe, betain ublažava proinflamatorne efekte MIF-a smanjujući koncentraciju IL-6 i IFN- γ . S druge strane, betain stimuliše antifibrogene efekte MIF-a smanjenjem TGF- β 1, PDGF-BB, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i taloženjem ECM (Coll1 I Coll3) u jetri.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Vukićević D**, Rovčanin B, Gopčević K, Stanković S, Vučević D, Jorgačević B, Mladenović D, Vesković M, Samardžić J, Ješić R, Radosavljević T. The role of MIF in hepatic function, oxidative stress, and inflammation in thioacetamide-induced liver injury in mice: Protective effects of betaine. *Curr Med Chem.* 2021;28,1-19. **(M21, IF=4.184)**
doi: 10.2174/0929867327666201104151025. Epub ahead of print. PMID: 33148149.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Dejstva makrofagnog migratornog inhibitornog faktora i betaina na morfofunkcionalne, ćelijske i tkivne promene u fibrozi jetre: epidemiološki značaj hronične bolesti jetre“, doktoranda Dušana Vukićevića, predstavlja originalan naučni doprinos razumevanju uloge MIF-a i betaina u fibrozi jetre. Fibroza jetre je patofiziološka posledica hepatičkog oštećenja i znak hronične bolesti jetre. Međutim, patogeneza fibroze jetre još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Do danas nije ustanovljena efikasna terapija fibroze jetre. Ovaj zdravstveni problem postaje sve važniji, jer je učestalost bolesti povezanih sa fibrozom jetre poprimila epidemijski karakter, tako da ova istraživanja doprinose rasvetljavanju patogeneze fibroze jetre i njenom preventivnom i terapijskom pristupu. Potrebno je naglasiti da je ovo prvo istraživanje modulatornih efekata betaina na fibrozu jetre posredovanu MIF-om. Rezultati ove studije ukazuju na MIF kao moguću metu u lečenju hroničnih bolesti jetre. Takođe, ovi rezultati sugerišu da se betain može koristiti kao terapijski faktor za prevenciju i lečenje hronične bolesti

jetre posredovane MIF-om. Štaviše, primenjeni model istraživanja predstavlja dobru osnovu za buduće ispitivanje antifibrogenih agenasa i time dodatno doprinosi da lekari praktičari hrabrije priđu prevenciji i lečenju ove bolesti, a istraživači dobiju nove ideje za njeno konačno suzbijanje.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. U uvodu su jasno definisani elementi koji su bili predmet rada. Ciljevi su jasno navedeni, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je aktuelna. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani, temeljno diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

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

Beograd, 10. juni 2021. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Danijela Vučević

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Prof. dr Kristina Gopčević

Prof. dr Janko Samardžić

Prof. dr Snežana Živančević Simonović

Mentor:

Prof. dr Tatjana Radosavljević

Komentor:

Prof. dr Nataša Maksimović
