

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На 6. редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. 04. 2018. године прихваћен је извештај ментора Ђорђа Миљковића о урађеној докторској дисертацији Сузана Станисављевић, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић” под насловом „Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса” и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. Др Ђорђе Миљковић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, ментор
2. Др Биљана Божић Недељковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
3. Др Наташа Голић, научни саветник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Сузана Станисављевић, под насловом „Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса” обухвата 134 странице текста, 14 слика, 32 графика и четири табеле. Текст се састоји од седам поглавља и то: Увод (14 страница), Циљеви рада (две странице), Материјал и методе (11 страница), Резултати (51 страница), Дискусија (15 страница), Закључци (три странице) и Литература (31 страница).

Предмет докторске дисертације је био да се испита улога ћелија лимфног ткива црева и микробиоте црева у отпорности Албино Оксфорд (АО) пацова на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ).

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у Одељењу за имунологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитета у Београду и Лабораторији за молекуларну микробиологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, а процедуре које су укључивале рад са животињама су одобрене од стране Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (решење бр. 04-04/15).

Резултати истраживања које је кандидат Сузана Станисављевић приказала у овој дисертацији пружају нова сазнања о улози микробиоте црева у патогенези ЕАЕ-а, анималног модела мултипле склерозе. Ови резултати имају значај за базично разумевање односа микробиоте црева и имунског система, преваходно у условима у којима постоји аутоимунска реакција против централног нервног система (ЦНС). Такође, они откривају и могућност да се модулација микробиоте црева користи у сврху терапије мултипле склерозе. Ови резултати добијају на значају ако се зна да је мултипла склероза хронична болест чија је етиологија и даље непозната и за коју не постоји терапија која доводи до излечења. Ова студија је обухватила како микробиоту црева, тако и имунске ћелије

лимфног ткива црева, периферних лимфних органа и оне добијене из ЦНС-а. Примењени су различити *in vitro* приступи и коришћен је модел ЕАЕ, у коме је примењен третман антибиотцима у циљу модулације састава микробиоте црева и функције имунског система, као и трансфер микробиоте црева као терапијски приступ. Захваљујући широком приступу у изучавању постављеног проблема, ова студија је изучавањем микробиоте црева и лимфног ткива црева у контексту патогенезе мултипле склерозе довела до открића нових елемената њене етиопатогенезе и нових могућности терапије ове болести.

Анализа докторске дисертације:

Увод се састоји од седам поглавља у којима је јасно представљена савремена слика неуроимунолошке области којом се дисертација бави. У прва два поглавља су приказана савремена сазнања о мултиплој склерози и њеном анималном моделу – ЕАЕ-у. У следећем поглављу је детаљније објашњена улога цитокина у њиховој патогенези. Потом су описане карактеристике сојева пацова који су коришћени у овој студији и објашњена њихова различита подложност индукцији ЕАЕ-а. Уследила су поглавља посвећена улози микробиоте црева у развоју мултипле склерозе и ЕАЕ, њеној модулацији применом антибиотика, као и њеној примени у терапији аутоимунских болести ЦНС-а.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања** кандидат полази од хипотезе да микробиота црева има значајну улогу у отпорности АО пацова на индукцију ЕАЕ-а, као и да модулација микробиоте црева АО пацова може нарушити ову отпорност. Такође, она претпоставља да би трансфер микробиоте црева АО пацова у Дарк Агути (ДА) пацове који су подложни индукцији ЕАЕ-а, могло да смањи њихову подложност ЕАЕ-у.

Имајући у виду основни циљ, успостављени су следећи специфични циљеви:

1. Да се установе разлике на нивоу лимфног ткива црева и микробиоте црева код АО и ДА пацова пре и након индукције ЕАЕ-а како би се идентификовали потенцијални ћелијски и молекулски фактори који су важни за отпорност на индукцију ЕАЕ-а
2. Да се изврши нарушавање отпорности АО пацова на индукцију ЕАЕ-а модулацијом састава микробиоте применом антибиотика
3. Извршити трансфер микробиоте црева АО пацова у ДА пацове како би се испитао њихов потенцијално терапеутски ефекат код ДА пацова који су подложни индукцији ЕАЕ-а.

Ова три циља су даље подељена на још конкретније циљеве који детаљно описују које животиње, које ћелије и који цитокини ће бити испитивани у овој студији.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описане коришћене методе и наведена коришћена једињења, укључујући и њихове произвођаче. Овај део дисертације је написан јасно и прецизно и омогућава читаоцу да и сам изведе експерименте приказане у овој дисертацији. Најпре су наведени реагенси, раствори и медијуми коришћени током израде експеримената. Потом су описани лабораторијски пацови коришћени у студији, као и метода индукције ЕАЕ-а и поступак праћења клиничке слике ове болести. Настављено је са приказом антибиотског третмана пацова, описом трансфера микробиоте црева у пацова. Потом су приказане методе изолације ћелија коришћених у студији, као и методе њихове карактеризације, укључујући одређивање вијабилитета, продукције цитокина, фенотипских маркера. У наредним поглављима је приказана методологија припреме и анализе хистолошких препарата. Следи детаљан опис узорковања и анализе микробиоте, укључујући изолацију ДНК, денатуришућу градијент гел електрофорезу и секвенцирање ДНК. Коначно, приказане су и методе статистичке обраде добијених података.

У делу **Резултати**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате својих истраживања у оквиру 32 поглавља груписаних у пет већих целина. Свако од поглавља је целина у којој је прецизно уведен предмет истраживања, у којој су описани поступци који

су коришћени, резултати који су добијени и конкретни закључци о добијеним резултатима. Ова поглавља су јасно логички повезана и читаоцу је лако да прати ток истраживања. Она, такође, у потпуности одговарају постављеним циљевима, и из њих се изводе закључци дисертације. У првој већој целини су приказани резултати који се тичу разлика између сојева АО и ДА на нивоу лимфног ткива црева. Показани су подаци о бројности ћелија, продукцији цитокина и фенотипској карактеризацији ћелија у Пејеровим плочама и лимфним чворовима мезентере неимунизованих пацова, као и пацова имунизованих да развију ЕАЕ. У следећим поглављима су приказани резултати анализе микробиоте пацова, како неимунизованих, тако и имунизованих. Следи приказ резултата антибиотског третмана код АО пацова. Приказан је утицај овог третмана на клиничку слику ЕАЕ-а, хистолошка анализа кичмене мождине, продукција цитокина у кичменој мождини, као и детаљна анализа утицаја овог третмана на ћелијску бројност, продукцију цитокина и фенотип имунских ћелија лимфног ткива црева и лимфних чворова који дренирају место имунизације. Такође, приказани су и резултати утицаја овог третмана на састав микробиоте црева АО пацова. Коначно, у 5. поглављу резултата су приказани резултати трансфера микробиоте црева из АО у ДА пацове, и то његов утицај на клиничку слику ЕАЕ-а, продукцију цитокина у кичменој мождини, на бројност ћелија у Пејеровим плочама, лимфним чворовима мезентере, лимфним чворовима који дренирају место имунизације, на њихов фенотип и продукцију цитокина од стране ових ћелија, као и на састав микробиоте црева ДА пацова.

У поглављу **Дискусија** је на почетку дат сиже остварених резултата. Следи опис значаја помоћничких Т лимфоцита типа 1 и 17 за патогенезу ЕАЕ-а и мултипле склерозе и дискусија о потенцијалној улози лимфног ткива црева у њиховој иницијацији, пропацији и регулацији. Након тога је наглашен значај кључних цитокина ових Т лимфоцита, IFN- γ и IL-17 у ЕАЕ-у и мултиплој склерози и затим детаљно продискутовани резултати који се односе на продукцију ових цитокина у лимфном ткиву црева АО и ДА пацова. Затим се дискутује о регулаторним Т лимфоцитима у ЕАЕ-у и мултиплој склерози и анти-инфламацијском цитокину IL-10 као основном регулаторном цитокину продукованом од стране регулаторних Т лимфоцита, са посебним нагласком на лимфна ткива црева. Дискусија се наставља описом значаја резултата везаних за састав микробиоте црева у АО и ДА пацовима, да би се фокусирао на последице антибиотског третмана АО пацова, како на нивоу саме микробиоте, тако и лимфног ткива црева и имунског система уопште, и, коначно, на у ЕАЕ-у индукованом у АО пацовима. У последњем делу дискусије се говори о трансферу микробиоте црева из АО у ДА пацове и значају ових резултата за терапију мултипле склерозе. Током читаве дискусије, кандидат критички сагледава своје резултате и упоређује их са резултатима других група. Уздржано и егзактно говори о значају својих резултата, наглашавајући објективан напредак у области који њени резултати доносе. Дискусија се завршава навођењем даљих могућих праваца истраживања и наглашавањем да резултати ове докторске дисертације указују да модулација микробиоте црева може бити валидан приступ у терапији мултипле склерозе, али уз још доста истраживања у будућности.

Дискусија се логично наставља у поглавље **Закључци**. У њему су закључци изведени према претходно наведеним конкретним циљевима, а формиран на основу солидних резултата и конкретне дискусије. Закључци су, као и циљеви груписани у три дела, посвећена поређењу микробиоте црева и лимфног ткива црева АО и ДА пацова, модулацији микробиоте црева и индукције ЕАЕ-а у АО пацова применом антибиотика и анти-енцефалитогеном дејству трансфера микробиоте црева из АО у ДА пацове. Коначно, дат је и општи закључак да су микробиота црева и лимфно ткиво црева изузетно значајни у патогенези ЕАЕ-а.

У поглављу **Литература** које садржи 223 библиографске јединице које су

релевантне по избору и броју, уз навођење најскоријих литературних података, види се озбиљан и студиозан приступ кандидата проблематици ове дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Stanisavljević S**, Lukić J, Momčilović M, Miljković M, Jevtić B, Kojić M, Golić N, Mostarica Stojković M, Miljković D. Gut-associated lymphoid tissue, gut microbes and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Benef Microbes*. 2016 Jun;7(3):363-73. doi: 10.3920/BM2015.0159. (M22)
https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/BM2015.0159?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed
2. **Stanisavljević S**, Lukić J, Soković S, Mihajlović S, Mostarica Stojković M, Miljković D, Golić N. Correlation of Gut Microbiota Composition with Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rats. *Front Microbiol*. 2016 Dec 15;7:2005. doi: 10.3389/fmicb.2016.02005. (M21)
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.02005/full>
3. **Stanisavljević S**, Dinic M, Jevtic B, Đedovic N, Momcilovic M, Đokic J, Golic N, Mostarica Stojkovic M, Miljkovic Đ. Gut microbiota confers resistance of Albino Oxford rats to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2018; 9:942. doi: 10.3389/fimmu.2018.00942 (M21)
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00942/full>

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Станисављевић С**, Лукић Ј, Момчиловић М, Миљковић М, Јевтић Б, Којић М, Голић Н, Мостарица Стојковић М, Миљковић Ђ. Улога микробиота црева и ГАЛТ-а и подложност индукцији ЕАЕ код пацова. 7. научни састанак друштва имунолога Србије. April, 2016., Београд
3. **Stanisavljević S**, Dinić M, Jevtić B, Đedović N, Momčilović M, Đokić J, Golić N, Mostarica Stojković M, Miljković Đ. Perturbation of gut microbiota annuls the resistance of female Albino Oxford rats to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. 7th Congress of Serbian Neuroscience Society, Октобар, 2017., Београд.

Мишљење и предлог комисије

Анализа докторске дисертације кандидаткиње **Сузане Станисављевић** под насловом „Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса” показује да је кандидат у својој докторској дисертацији успешно реализовала постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан и адекватно конципиран експериментални рад. Докторска дисертација представља оригиналан научни рад у области имунологије који истражује патогенезу мултипле склерозе и могућност њене терапијске модулације. Ова докторска дисертација својом поставком и резултатима доприноси разумевању улоге лимфног ткива црева и микробиоте црева у патогенези ЕАЕ-а и мултипле склерозе. Њени резултати јасно указују да модулација микробиоте црева води променама у функционисању имунског система и променама у подложности индукцији ЕАЕ-а. Они указују да су даља истраживања у овој области неопходност која води бољем разумевању етиопатогенезе мултипле склерозе и, коначно, њеној ефикаснијој терапији.

Самосталност у планирању и експерименталној реализацији истраживања, као и у тумачењу и критичком разматрању резултата које је кандидаткиња показала у раду, говоре о добром познавању научне области којој обрађена проблематика припада. Као резултат, истраживања приказана у овој дисертацији су публикована у три научна рада. Кандидаткиња има укупно 10 радова из уже научне области, од чега четири као први аутор што говори о њеној посвећености научном раду и изузетној испешности у бављењу њиме. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос успешног младог истраживача.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације кандидата Сузане Станисављевић „Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса”, допринос ове дисертације, у смислу откривања нових елемената патогенезе мултипле склерозе и приближавања открићу новог терапијског приступа лечењу ове болести, перспективу даљих истраживања у овој области, те креативност и личне квалитете кандидата, као и број објављених научних радова, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације и последично стицање академског звања доктора биолошких наука Сузане Станисављевић.

КОМИСИЈА:

У Београду, 07.05.2018. године.

Др Ђорђе Миљковић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитет у Београду, ментор

Др Биљана Божић Недељковић, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан

Др Наташа Голић, научни саветник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитет у Београду, члан