

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.05.2019. године, прихваћен је извештај ментора Ђорђа Миљковића о урађеној докторској дисертацији **Неде Г. Ђедовић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под насловом **„Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу

др Ђорђе Миљковић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

др Биљана Божић Недељковић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Ирена Лаврња, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

Комисија је прегледала написану докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Неде Ђедовић под насловом **„Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису“** обухвата 121 страницу текста, 16 слика, 14 графика и једну табелу. Текст се састоји од седам поглавља и то: Увод (14 страница), Циљеви рада (две странице), Материјал и методе (22 странице), Резултати (41 страница), Дискусија (10 страница), Закључци (две странице) и Литература (21 страница).

Предмет докторске дисертације је био да се испита антиенцефалитогени потенцијал етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису (ЕАЕ).

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у Одељењу за имунологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитета у Београду. Део докторске дисертације везан за испитивање утицаја етил-пирувата на ћелије централног нервног система урађен је у сарадњи са Одељењем за неуробиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. Део докторске дисертације везан за испитивање утицаја етил-пирувата на људске дендритске ћелије је урађен на Одељењу за имунологију Германс Триас и Пујол Универзитетске болнице и истраживачког института у Бадалони, Шпанија. Процедуре које су укључивале рад са животињама су одобрене од стране Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (решења бр. 01-09/16, бр. 02-09/16, бр. 03-01/17).

Резултати истраживања које је кандидаткиња Неда Ђедовић приказала у овој дисертацији пружају оригинална сазнања о утицају етил-пирувата на ЕАЕ, животињски модел мултипле склерозе. Ови резултати, преваходно доприносе откривању нових терапијских могућности за третман мултипле склерозе, базираних на директној примени етил-пирувата или на стварању толерогених дендритских ћелија под утицајем етил-пирувата које би се потом могле користити као ћелијска имунотерапија. Нови терапијски приступи у третману мултипле склерозе су неопходни, имајући у виду да је то болест за коју не постоји терапија која доводи до излечења. Такође, резултати ове докторске дисертације имају значај и за базично разумевање патогенезе ЕАЕ-а и мултипле склерозе, односно аутоимунског одговора усмереног против централног нервног система (ЦНС-а). Ова студија је обухватила *ex vivo* проучавање различитих популација имунских ћелија, укључујући Т лимфоците, макрофаге и дендритске ћелије које су добијене из лимфних органа и/или изоловане из ЦНС-а. Такође, имунске ћелије, као и резидентне ћелије ЦНС-а (астроцити, микроглија, неурони) су проучаване и *in situ* на хистолошким пресецима кичмених мозгова. Примењени су различити *in vitro* приступи и коришћен је модел ЕАЕ, у коме је примењен третман етил-пируватом у циљу модулације клиничке слике и функције имунског система. Такође, извршена је апликација толерогених дендритских ћелија индукованих етил-пируватом мишевима у циљу модулације имунског одговора индукованог активном имунизацијом комплетним Фројндовим адјувансом. Захваљујући свеобухватном приступу у проучавању постављеног проблема, ова студија је изучавањем утицаја етил-пирувата на ћелијске и молекулске компоненте укључене у патогенезу мултипле склерозе у животињском моделу довела до открића нових могућности терапије ове болести.

Анализа докторске дисертације:

Увод се састоји од пет 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 животињском моделу – ЕАЕ-у, укључујући значај аутоимунског одговора усмереног против ЦНС-а за патогенезу ових болести. У следећем поглављу је дат опис доприноса различитих имунских ћелија патогенези ових болести. Посебна пажња је посвећена дендритским ћелијама и помоћничким Т лимфоцитима као основним покретачима аутоимунског одговора усмереног против ЦНС-а. Затим је представљена савремена терапија мултипле склерозе и описан потенцијал ћелијске имунотерапије у третману ове болести. Коначно, у петом поглављу је дат приказ биохемијских особина етил-пирувата са фокусом на његова позната биолошка дејства, како *in vitro*, тако и *in vivo*.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања** кандидаткиња полази од познатих података научних истраживања која показују да етил-пируват има антиинфламацијско дејство и поставља хипотезу да би овај молекул могао остварити и антиенцефалитогено деловање у ЕАЕ-у, као и да би могао модулисати фенотипске и функцијске карактеристике макрофага и дендритских ћелија. У складу са наведеном хипотезом постављени су следећи специфични циљеви:

1. Да се испита утицај *in vivo* третмана етил-пирувата на ток ЕАЕ-а код ДА пацова и ћелије у ЦНС-у које су значајне за патогенезу ове болести.
2. Да се испита утицај *in vitro* третмана етил-пируватом на макрофаге диференциране из прекурсорских ћелија костне сржи и перитонеалне макрофаге пацова.
3. Да се испита утицај *in vitro* третмана етил-пируватом на мишије дендритске ћелије диференциране из прекурсорских ћелија костне сржи.
4. Да се испита толерогени потенцијал етил-пирувата *in vitro* на дендритске ћелије диференциране из моноцита периферне крви здравих људи и пацијената оболелих од мултипле склерозе, као и да се ефикасност етил-пирувата упоредити са витамином Д3.

Ова четири циља су даље подељена на још конкретније циљеве који ће се спровести применом методологије представљене у следећем поглављу.

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 описане експерименталне животиње коришћене у студији. Следи опис метода за изолацију, пречишћавање и пропацију различитих популација имунских ћелија. Потом су описане методе одређивања вијабилитета и броја ћелија. Дат је и приказ метода индукције ЕАЕ-а у пацова, поступак праћења клиничке слике ове болести, као и детаљан опис третмана пацова етил-пируватом. Потом су приказане методе изолације имунских ћелија из кичмене мождине, као и припреме кичмене мождине за имунохистохемијску анализу. Следи приказ метода за одређивање функционалних особина имунских ћелија, укључујући ELISA тест, реакцију ланчаног умножавања у реалном времену, цитофлуориметрију и имуноцитохемију. Посебна пажња посвећена је методима одређивања пролиферације ћелија у систему алогене кокултивације. Затим је дат приказ примене дендритских ћелија третираних етил-пируватом *in vivo* у мишевима. Коначно, наведени су и статистички тестови који су коришћени у анализи добијених података.

У делу **Резултати**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате својих истраживања у оквиру 28 поглавља, од којих је свако целина у којој је прецизно уведен предмет истраживања, у којој су описани примењени поступци, добијени резултати 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. Кандидаткиња у првих 10 поглавља приказује резултате који се тичу утицаја етил-пирувата на ток ЕАЕ-а, на инфилтрацију ћелија у кичмену мождину током ЕАЕ-а, на продукцију цитокина у ћелијама које инфилтрирају кичмену мождину током ЕАЕ-а, на макрофаге и микроглију у ЦНС-у пацова у ЕАЕ-у, на активацију микроглије у ЕАЕ-у, на астроците и неуроне у ЕАЕ-у, на ниво експресије протеина HMGB1 у ЦНС-у пацова у ЕАЕ-у, на ниво експресије иРНК за Hmgb1 у централном нервном систему пацова у ЕАЕ-у, на локализацију HMGB1 у ћелијама кичмене мождине пацова у ЕАЕ-у. У наредна два поглавља се приказује имуномодулацијски утицај етил-пирувата на макрофаге диференциране из костне сржи и перитонелане макрофаге *in vitro*. Следећих 12 поглавља је посвећено утицају етил-пирувата на дендритске ћелије диференциране из костне сржи мишева, и то на њихов вијабилитет, на продукцију цитокина у њима, на експресију површинских молекула на њима, на њихову способност да изврше активацију CD4⁺T-ћелија *in vitro*, на Nrf2, HQO1, HO-1, NF-κB у њима, као и на њихову величину и

морфологију. Такође, међу овим поглављима су и она која показују миграцију мишићних дендритских ћелија третираних етил-пируватом *in vivo*, као и испитивање њиховог ефекта на имунски одговор у лимфним чворовима мишева изазван активном имунизацијом, укључујући њихов ефекат на удео CD4⁺ Т лимфоцита који продукују IL-10, IL-17 и IFN- γ . Коначна четири поглавља описују утицај етил пирувата на дендритске ћелије добијене из моноцита периферне крви здравих људи и пацијената оболелих од мултипле склерозе. У овим поглављима је дат упоредни преглед утицаја етил-пирувата и витамина Д3 на вијабилитет, на експресију површинских молекула дендритских ћелија, на њихову способност да изврше активацију моноклеарних ћелија периферне крви *in vitro*, као и на продукцију цитокина у алогеној кокултури.

У поглављу **Дискусија** је на почетку дат сажетак остварених резултата. Следи компаративна анализа утицаја етил-пирувата на ЕАЕ и друге животињске моделе инфламацијских болести, као и његовог утицаја и утицаја његовог редокс аналога диметил-фумарата, молекула који је основа лека текфидера који се користи у терапији мултипле склерозе. Затим се дискутује значај запаженог утицаја етил-пирувата на CD4⁺ Т лимфоците типа 1 и 17, као и на друге релевантне ћелије имунског система и резидентне ћелије ЦНС-а у контексту патогенезе ЕАЕ-а и мултипле склерозе. Посебна пажња посвећена је дискусији значаја запаженог утицаја етил-пирувата на HMGB1 у ЦНС-у пацова у ЕАЕ-у, а пре свега у макрофагима и микроглији. Следи дискусија о утицају етил-пирувата на имунске ћелије које презентују антигене, фокусирана на релевантне површинске молекуле укључене у овај процес, као и на ефекторске молекуле које ове ћелије продукују. Детаљно су продискутовани и молекулски механизми деловања етил-пирувата на дендритске ћелије. Разматран је и значај запажених последица примене дендритских ћелија третираних етил-пируватом у мишева. Посебна пажња посвећена је упоредној анализи утицаја етил-пирувата и витамина Д3, као стандардног толерогеног једињења за људске дендритске ћелије. Дискусија се завршава критичким разматрањем могућности примене дендритских ћелија третираних етил-пируватом у ћелијској имунотерапији мултипле склерозе и других аутоимунских болести.

Дискусија се логично наставља у поглавље **Закључци**. У њему су закључци изведени према претходно наведеним конкретним циљевима, а формиран на основу добијених резултата и конкретне дискусије. Закључци су, као и циљеви груписани у четири дела, посвећена антиенцефалитогеном дејству етил-пирувата у ЕАЕ-у, његовом имуносупресивном деловању на макрофаге, његовом толерогеном деловању на мишиће

дендритске ћелије, као и на људске дендритске ћелије. Коначно, дат је и општи закључак да је етил-пируват потентно имуномодулацијско једињење, вредно даљих испитивања на тему коришћења његових позитивних дејстава у терапији мултипле склерозе и других аутоимунских обољења.

У поглављу **Литература** које садржи 214 библиографских јединица, које су релевантне по избору и броју, уз навођење најскоријих литературних података, види се озбиљан и студиозан приступ кандидаткиње проблематици ове дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21**
Djedović N, Stanisavljevic S, Jevtić B, Momčilović M, Lavrnja I, Miljković D. Anti-encephalitogenic effects of ethyl pyruvate are reflected in the central nervous system and the gut. *Biomed Pharmacother.* 2017 Sep 28;96:78-85. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.110.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332217331694>

2. **M21**
Djedovic N, Mansilla MJ, Jevtić B, Navarro-Barriuso J, Saksida T, Martínez-Cáceres EM, Miljković Đ. Ethyl Pyruvate Induces Tolerogenic Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2019 Feb 7;10:157. doi: 10.3389/fimmu.2019.00157.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00157/full>

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1.
Neda Đedović, María José Mansilla, Suzana Stanisavljević, Juan Navarro-Barriuso, Bojan Jevtić, Eva Martínez-Cáceres, Đorđe Miljković. Tolerogenic effects of ethyl pyruvate on dendritic cells. 10-14 jun 2018. „15th International Symposium on Dendritic cells“, Aachen, Germany, knjiga sažetaka. Stranica 23.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1.
Neda Đedović, Suzana Stanisavljević, Bojan Jevtić, Gordana Timotijević, Miljana Momčilović, Marija Mostarica Stojković, Đorđe Miljković. Tolerogenic dendritic cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. 20-22 septembar 2017 „First Congress of Molecular Biologists of Serbia“, Beograd, Srbija, knjiga sažetaka. Stranica 117.

2.
Neda Đedović, María José Mansilla, Bojan Jevtić, Juan Navarro-Barriuso, Suzana Stanisavljević, Eva Martínez-Cáceres, Đorđe Miljković. Tolerogene dendritske ćelije indukovane etil-piruvatom. Svetski dan imunologije-2018. Knjiga sažetaka.

Мишљење и предлог Комисије:

Анализа докторске дисертације кандидаткиње **Неде Ђедовић** под насловом „**Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**” показује да је кандидаткиња 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, углавном на животињском моделу ове болести, а пре свега могућност њене терапијске модулације. Ова докторска дисертација својом поставком и резултатима дефинише етил-пируват као потентно имуномодулацијско једињење које би се могло користити у терапији мултипле склерозе. Његова примена би могла бити директна. Такође, етил пируват би се могао користити за третман дендритских ћелија пацијената у циљу добијања толерогених дендритских ћелија које би се могле користити као ћелијска имунотерапија. Резултати ове докторске дисертације дају јасну слику ћелијских и молекулских дејстава етил-пирувата у аутоимуности усмереној против ЦНС-а. Исто тако јасно ови резултати указују да су неопходна даља истраживања могућности примене етил-пирувата у терапији мултипле склерозе, али и других аутоимунских и хроничних инфламацијских болести. Ова будућа истраживања би требало да буду заснована на предклиничким студијама, као и на транслацији ка клиничким студијама. 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 два научна рада у којима је Неда Ђедовић први аутор. Кандидаткиња има укупно 13 радова из уже научне области, од чега четири као први аутор што говори о њеној посвећености научном раду и изузетној успешности у бављењу њиме. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос успешне младе научнице.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације кандидаткиње Неде Ђедовић „Механизми антиенцефалитогеног дејства етил-пирувата у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису”, допринос ове дисертације, у смислу приближавања открићу новог терапијског приступа лечењу мултипле склерозе, 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 Извештај и упути предлог Већу научних области природних наука Универзитета у Београду да прихвати Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Неде Ђедовић.

У Београду, 13.05.2019. године.

КОМИСИЈА:

др Ђорђе Миљковић, научни саветник
Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитета у Београду

др Биљана Божић Недељковић, редовни професор
Универзитет у Београду- Биолошки факултет

др Ирена Лаврња, научни саветник
Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитета у Београду