

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.03.2020. године, на основу молбе ментора, Данијеле Лакета, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду и Ирене Лаврња, научног саветника ИБИСС, Универзитет у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Марије А. Јаковљевић (рођене Јовановић)**, истраживача-сарадника, запослене на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду под насловом: **„Значај сигнализације посредоване ванћелијским пуринским нуклеотидима у неуроинфламацији и демијелинизацији – импликације у мултиплој склерози“**, у саставу: др Надежда Недељковић, редовни професор Биолошког факултета – Универзитет у Београду, др Ирена Лаврња, научни саветник ИБИСС, Универзитет у Београду, др Ђорђе Миљковић, научни саветник ИБИСС, Универзитет у Београду, др Ивана Грковић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду, и др Данијела Лакета, доцент Биолошког факултета - Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Марије А. Јаковљевић (рођене Јовановић) написана је на 136 страна и садржи поглавља: Насловна страна (на српском и енглеском језику), Подаци о менторима и члановима комисије, Сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима (Увод – 22 стране, Циљеви – 1 страна, Материјал и методе -18 страна, Резултати – 40 страна, Дискусија – 16, Закључци – 2 стране, Списак литературе - 33 стране, Прилози – 4 стране) и Прилози (Биографија, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу). Списак литературе садржи 471 референцу, Увод је илустрован шемама (3), а Резултати и Прилози композитним сликама (28, односно 4), док поглавља Материјал и методе и Резултати садрже табеле (15, односно 2).

Анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације кандидаткиња даје јасан преглед литературе која се односи на неуроинфламацију, са посебним освртом на етиопатогенезу мултипле

склерозе (МС), као и њеног најшире прихваћеног анималног модела - експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ), коришћеног у експериментима у оквиру ове дисертације. Кандидаткиња даје детаљан преглед карактеристика и улога кључних учесника у неуроинфламацији, како резидентних ћелија централног нервног система (ЦНС) - астроцита и микроглије, тако и периферних имунских ћелија - моноцита/макрофага и Т-лимфоцита. С обзиром на то да ток неуроинфламације у великој мери зависи од активационог фенотипа микроглије/макрофага (М1/М2), као и астроцита (А1/А2), посебна пажња је посвећена карактеристикама и улогама поменутих фенотипова. Како у условима неуроинфламације током МС/ЕАЕ долази до оштећења олигодендроцита и последичне демиелинизације прећене неуродегенерацијом, што доводи до појаве карактеристичних симптома болести, детаљно су описане карактеристике ових ћелија, као и фактори који доводе до њиховог оштећења, али и улога олигодендроцитних прекурсора у процесу ремиелинизације током опоравка. Имајући у виду да се ова докторска дисертација бави променама пуринске сигнализације у неуроинфламацији током ЕАЕ, кандидаткиња даје детаљан опис карактеристика и познатих улога сигналних молекула (АТФ и аденозина), рецептора (P2X, P2Y и P1) и ензима ектонуклеотидазе укључених у овај тип међућелијске сигнализације, са фокусом на ектонуклеотидазе најзаступљеније у ЦНС – ектонуклеозид трифосфат дифосфохидролазу 1 и 2 (NTPDase1/CD39 и NTPDase 2) и екто-5'-нуклеотидазу (eN/CD73).

Циљеви су представљени концизно: Испитати промене на нивоу компоненти пуринске сигнализације током ЕАЕ у кичменој мождини пацова у погледу 1) хистолошке дистрибуције и квантитативних промена експресије NTPDase1/CD39; 2) идентификације резидентних и инфилтрираних ћелија које експримирају NTPDase1/CD39 и процене њиховог инфламацијског фенотипа у контексту М1/М2 поларизације за микроглију/макрофаге, односно А1/А2 за астроците; 3) експресије NTPDase1/CD39 на CD4, CD40 и CD45⁺ ћелијама изоловане мононуклеарне фракције на врхунцу болести; 4) хистолошке дистрибуције и квантитативних промена експресије NTPDase2; 5) експресије пуринских P2 и P1 рецептора; 6) експресије NTPDase1 и 2 и eN/CD73 на CD4⁺ и CD4⁻ ћелијама дренажујућег лимфног чвора. Додатно, 7) утицај проинфламацијских фактора на вијабилност и функционалност, као и експресију eN/CD73 код ћелијске линије олигодендроцитних прогенитора Oli-neu.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно су описане методе, протоколи и реагенси коришћени у експериментима у оквиру ове докторске дисертације. Кандидаткиња је применила велики број молекуларно-биолошких, биохемијских и аналитичких метода, као и методе имунофлуоресцентног, конфокалног и светлосног микроскопирања, а у квантитативној анализи добијених резултата користила је одговарајуће математичке и статистичке методе. Примењено је преко 30 специфичних примарних и секундарних антитела, приближно 30 специфичних нуклеотидних прајмера за ланчану реакцију полимеразе, као и специфична олигонуклеотидна проба за методу *in situ* хибридизације. Описане су методе индукције ЕАЕ код женки пацова подложног соја Dark Agouti, као и

праћења тока болести проценом неуролошких симптома на стандардној скали 1-5. Поред тога, детаљно је описан поступак одржавања ћелијске културе олигодендроцитних прогенитора миша Oli-neu, третмани проинфламацијским факторима (LPS, ATP, TNF α , IFN γ), као и поступак одређивања вијабилности коришћењем два есеја - Cell Titer Blue (СТВ) и 3-(4,5'-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијум бромид (МТТ), процена степена пролиферације ћелија и морфометријска анализа. Описане су и методе изолације иРНК из кичмене мождине и из ћелијске културе, синтезе комплементарне ДНК, одређивања оптималне температуре хибридизације прајмера, ланчане реакције полимеразе и ланчане реакције полимеразе у реалном времену као и метода детекције контаминације геномском ДНК. Описане су методе изолације грубе мембранске фракције из кичмене мождине, мембранске фракције и укупних протеина из ћелијске културе, метода одређивања концентрације протеина и анализа протеинске експресије методом имуноблота, као и анализа активности ектонуклеотидаза применом ензимског есеја. Детаљно су описани протоколи за припрему ткива, као и методе имунохистохемијског и имунофлуоресцентног обележавања и методу *in situ* хибридизације. Кандидаткиња је детаљно описала и методу изолације моноклеарне фракције ћелија из кичмене мождине пацова и изолацију периферних имунских ћелија из дренажујућег лимфног чвора, као и анализу ћелијске експресије протеина методом проточне цитофлуориметрије.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је на прегледан и концизан начин приказала резултате своје дисертације илуструјући их композитним сликама и табелама. Резултати добијени у оквиру *in vivo* студије везано за промене пуринске сигнализације током ЕАЕ показали су да на нивоу свих испитиваних компоненти пуринског сигналног система (главних ектонуклеотидаза ЦНС, пуринских P2 и P1 рецептора) долази до фазно – специфичних промена експресије у кичменој мождини пацова. Кандидаткиња је показала да на врхунцу болести долази до пораста експресије NTPDase1/CD39 и eN/CD73, што указује на могуће смањење нивоа ванћелијског ATP и пораста аденозина и потенцијалне антиинфламацијске ефекте уочених промена. Додатно, показано је и да до пораста експресије NTPDase1/CD39 на врхунцу ЕАЕ долази услед масовне инфилтације периферних имунских ћелија и активације микроглије. Кандидаткиња је указала на врло селективну дистрибуцију NTPDase2 на астроцитима у белој маси кичмене мождине, као и смањену експресију поменутог ензима на врхунцу болести и утврдила да је уочена промена узрокована смањењем експресије на овим ћелијама. Истовремени пораст експресије NTPDase1/CD39 и смањење NTPDase2, заједно са променама експресије ADP-зависних P2 рецептора указују на могуће смањење ADP – зависне сигнализације током ЕАЕ. Кандидаткиња је применом квалитативне и квантитативне анализе имунофлуоресценције показала да је међу активираним микроглијом/макрофагима на почетку ЕАЕ заступљенији фенотип налик M1, док је на врхунцу болести, при максималном броју ових ћелија заступљенији фенотип налик M2, уз присуство мешовитих форми M1/M2 фенотипа у обе временске тачке. Кандидаткиња је додатно показала и већу повезаност NTPDase1/CD39 са фенотипом налик M2, што заједно са претходним наводи на закључак да на врхунцу ЕАЕ долази до транзиције из про- у антиинфламацијски фенотип микроглије/макрофага чија су својства додатно потенцирана снажном експресијом ове ектонуклеотидазе. У складу са резултатима који се односе на микроглију/макрофаге,

кандидаткиња је показала да паралелно са њиховом транзицијом у правцу антиинфламацијског фенотипа долази и до активације астроцита у правцу неуропротективног A1 фенотипа. Уз помоћ проточне цитофлуориметрије кандидаткиња је показала да највећи део моноклеарне фракције ћелија изоловане из кичмене мождине на врхунцу ЕАЕ чине ћелије хематопоетског порекла које већински експримирају NTPDazu1/CD39, док је експресија најизраженија код ћелија које представљају макрофаге и активiranу микроглију. Поред промена експресије главних ектонуклеотидаза у ЦНС током ЕАЕ кандидаткиња је демонстрирала и промене њихове експресије на периферији, на CD4⁺ и CD4⁻ популацијама имунских ћелија изолованих из дренирајућег лимфног чвора, што указује на значајну и сложену улогу пуринске сигнализације у неуроинфламацији. У оквиру *in vitro* студије на ћелијској линији олигодендроцитних прогенитора Oli-neu, кандидаткиња је показала да проинфламацијски фактори TNF α и АТР изазивају пораст експресије eN/CD73, која је у физиолошким условима најјаче експримирана ектонуклеотидаза ових ћелија. Имајући у виду да је кандидаткиња показала и да је у кичменој мождини једино eN/CD73 од три испитиване ектонуклеотидазе експримирана на ћелијама олигодендроцитне лозе, и то на прогениторским ћелијама, док је на зрелим олигодендроцитима нема, добијени резултати сугеришу да би проинфламацијски фактори могли имати негативан ефекат на сазревање олигодендроцитних прогенитора а тиме и на процес ремиелинизације током ЕАЕ.

У оквиру **Дискусије** кандидаткиња је анализирала резултате своје докторске дисертације у односу на литературне податке на основу 471 наведене референце. Кандидаткиња је показала зрелост у тумачењу добијених резултата и разумевање њиховог потенцијалног физиолошког и патофизиолошког значаја, како за ток неуроинфламације тако и за опоравак у ЕАЕ/МС.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња је сумирала резултате своје докторске дисертације кроз 7 појединачних и један општи закључак:

1. Пораст експресије NTPDaze1/CD39 током ЕАЕ највећи је на врхунцу болести, а главни носиоци ове промене су активирани микроглија/макрофаги и остале инфилтриране имунске ћелије;
2. Међу активираним микроглијом/макрофагима долази до транзиције из фенотипа налик M1 заступљенијег на почетку ЕАЕ у фенотип налик M2 на врхунцу, праћене порастом експресије NTPDaza1/CD39 што би могло додатно да потенцира антиинфламацијска својства поменутог фенотипа. Током ЕАЕ, паралелно са активацијом микроглије долази и до активације астроцита у правцу неуропротективног фенотипа;
3. Највећи део моноклеарне фракције ћелија изоловане из кичмене мождине на врхунцу ЕАЕ чине ћелије хематопоетског порекла које у великој мери експримирају NTPDaza1/CD39, при чему је тај удео највећи код ћелија које представљају активiranу микроглију/макрофаге;
4. NTPDaza2 у кичменој мождини показује врло селективну дистрибуцију експримирајући се углавном на фиброзним астроцитима, док током ЕАЕ њена експресија опада услед смањења експресије на овим ћелијама;
5. Промене експресије главних ектонуклеотидаза ЦНС праћене су фазно-специфичним променама експресије свих анализираних пуринских рецептора изузев

A2A аденозинског рецептора, што указује да је пуринска сигнализација током EAE измењена у садејству поменутих кључних чинилаца;

6. NTPDase1/CD39, NTPDase2 и eN/CD73 експримирају се и на CD4⁺ и на CD4⁻ фракцији ћелија дренажућег лимфног чвора, а током EAE експресија сва три ензима се мења у обе популације ћелија;
7. Проинфламацијски фактори ATP и TNF α изазивају пораст експресије eN/CD73 код ћелијске линије олигодендроцитних прогенитора Oli-neu, а како је у кичменој мождини експресија ове ектонклеотидазе повезана искључиво са олигодендроцитним прекурсорима може се закључити да би проинфламацијски фактори могли да остварују негативан утицај на сазревање олигодендроцита а тиме и на ремијелинизацију током EAE.

Коначно, изведен је и општи закључак да током EAE долази до промена експресије свих најважнијих компоненти пуринског сигналног система у кичменој мождини пацова, пре свега главних ектонклеотидаза ЦНС за чије промене су одговорни углавном микроглија/макрофаги и астроцити. Уочене промене вероватно доприносе развоју антиинфламацијског миљеа а тиме и антиинфламацијској транзицији микроглије/макрофага и активацији астроцита у правцу неуропротективног фенотипа. У погледу ефеката проинфламацијских фактора на ћелијску линију олигодендроцитних прогенитора миша Oli-neu, на нивоу пуринске сигнализације долази до пораста експресије eN/CD73 што би могло да указује на негативне ефекте инфламације на сазревање прогенитора а тиме и на процес ремијелинизације. Приказани резултати могу представљати основ за развој нових терапеутских приступа у лечењу неуроинфламације кроз подстицање антиинфламацијске активације микроглије и астроцита путем модулације пуринске сигнализације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Jakovljevic M**, Lavrnja I, Bozic I, Milosevic A, Bjelobaba I, Savic D, Sevigny J, Pekovic S, Nedeljkovic N, Laketa D. 2019. Induction of NTPDase1/CD39 by reactive microglia and macrophages is associated with the functional state during EAE. *Frontiers Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00410> (M21) (*Neurosciences*, 77/261, IF₂₀₁₇= 3.877)
2. **Jakovljevic M**, Lavrnja I, Bozic I, Savic D, Bjelobaba I, Pekovic S, Sevigny J, Nedeljkovic N, Laketa D. Down-regulation of NTPDase2 and ADP-sensitive P2 Purinoceptors Correlate with Severity of Symptoms during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Cell Neurosci.* 2017, 11:333, doi: [10.3389/fncel.2017.00333](https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00333) (M21) (*Neurosciences*, 55/256, IF₂₀₁₅= 4.609)

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Jakovljević M**, Lavrnja I, Božić I, Milosević A, Bjelobaba I, Savić D, Peković S, Nedeljković N, Laketa D. NTPDase1/CD39 expression is increased during EAE in association with number and activation state of microglia/macrophages. (2019) FENS Regional Meeting 2019, Belgrade, Serbia, 10-13 July, Book of Abstracts: P267.
2. Laketa D, **Jakovljević M**, Božić I, Bjelobaba I, Savić D, Peković S, Nedeljković N, Lavrnja I. Microglia-related increase in NTPDase1 expression during EAE. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2019, Germany, 20-23 March, Book of abstracts: P558.
3. **Jovanović M**, Adžić M, Božić I, Bjelobaba I, Lavrnja I, Laketa D, Peković S, Kipp M, Nedeljković N. NTPDase2 is downregulated by white matter fibrous astrocytes in two distinct models of demyelination. Seventh Joint Italian-German Purine Club Meeting “Advances in Basic and Translational Purinergic Research”. Published in: Purinergic Signalling – Abstracts from the 2017 Italian – German Purine Club Meeting. DOI 10.1007/s11302-017-9581-4. Rome, Italy, Jul 20 – 22, 2017.
4. **Jovanović M**, Adžić M, Božić I, Lavrnja I, Laketa D, Nedeljković N. ATP-hydrolyzing membrane enzyme CD39L1/NTPDase2 – a novel player in neuroinflammation? FENS Regional Meeting 2017. Pecs, Hungary, Sep 20 – 23, 2017. [P1-244]
5. **Jovanović M**, Adžić M, Lavrnja I, Savić D, Božić I, Laketa D, Peković S, Kipp M, Nedeljković N. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is upregulated in oligodendrocyte progenitor cell line Oli-neu under proinflammatory conditions. FENS Featured Regional Meeting. Thessaloniki, Greece, Oct 07-10, 2015. [MO95]

B3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Jakovljević M**, Lavrnja I, Božić I, Adžić M, Bjelobaba I, Savić D, Peković S, Nedeljković N, Laketa D. ADP receptors P2Y1, P2Y12 and P2Y13 are differentially regulated in a rat model of multiple sclerosis. 7th Congress of Serbian Neuroscience Society, Belgrade, Serbia, Oct 25 – 27, 2017. [A22]
2. **Jovanović M**, Peković S, Nedeljković N. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is regulated in oligodendrocytes under proinflammatory conditions. Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students, Belgrade, Serbia, Jan 15 – 18, 2015.

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Марије А. Јаковљевић (рођене Јовановић) Б3049/2013, послата је дана 24.02.2020. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 24.02.2020.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Значај сигнализације посредоване ванћелијским пуринским нуклеотидима у неуроинфламацији и демиелинизацији – импликације у мултиплој склерози“, кандидата Марије А. Јаковљевић, констатујем да утврђено подударање текста износи **18%** уз искључена преклапања цитата и библиографских података о коришћеној литератури. Овај степен подударности

условљен је преклапањем личних имена, општих научних термина, стандардних лабораторијских протокола, претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из ове дисертације, а у највећој мери се односи на обавезне прилоге докторској дисертацији што је у складу са чланом 9. Правилника.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Марије А. Јаковљевић, под насловом „Значај сигнализације посредоване ванћелијским пуринским нуклеотидима у неуроинфламацији и демиелинизацији – импликације у мултиплој склерози“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Имајући у виду докторску дисертацију кандидаткиње Марије А. Јаковљевић (рођене Јовановић), као и публикације које су проистекле из резултата ове дисертације, Комисија закључује да ова дисертација представља оригинални научни допринос области пуринске сигнализације као и неуроинфламације. Резултати представљени у овој дисертацији имају посебан значај у откривању улоге главних ектонуклеотидаза ЦНС - NTPDaza1 и 2, као и eN/CD73 у току неуроинфламације и последичној демиелинизацији, као и опоравку током ЕАЕ/МС. Добијени резултати указују да су промене експресије поменутих ектонуклеотидаза укључене у креирање антиинфламацијског миљеа у ЦНС и усмеравање неуроинфламације у правцу разрешења и по први пут су указали и на значај сигнализације посредоване ADP-ом у ЕАЕ/МС. У том смислу, приказани резултати имају шири значај и могу допринети развоју нових терапеутских приступа у лечењу МС, али и других неуроинфламацијских патологија, путем модулације пуринске сигнализације пре свега на глијским ћелијама ЦНС, али и на периферним имунским ћелијама.

КОМИСИЈА:

У Београду, 24.04.2020. године

др Данијела Лакета, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Ирена Лаврња, научни саветник, ИБИСС, Универзитет у Београду

др Надежда Недељковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Ђорђе Миљковић, научни саветник, ИБИСС, Универзитет у Београду

др Ивана Грковић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке Винча,
Универзитет у Београду