

NAU N O M V E U M E D I C I N S K O G F A K U L T E T A  
U N I V E R Z I T E T A U B E O G R A D U

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, odluka broj 5940/4, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom  
ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis*“**

Kandidata dr Ivane Miti , zaposlene u Institutu za primenu nuklearne energije u Beogradu kao istraživa saradnik na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju. Mentor je prof. dr Miloš Markovi , komentor je viši nau ni saradnik dr Nataša Ili .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dušan Popadi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Dr Ljiljana Sofroni -Milosavljevi , nau ni savetnik Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Vu evi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Ivane Miti napisana je na 124 strane i podeljena na slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 tabela i 38 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korištenih u tekstu.

U **Uvodu** je opisana povezanost autoimunosti i infekcija različitim patogenima sa posebnim osvrtom na infekciju parazitom *Trichinella spiralis*. Navedena su i opisana imunomodulatorna svojstva infekcije ovim parazitom sa osvrtom na eksperimentalni model bolesti multiple skleroze - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE).

Opisana je imunopatogeneza multiple skleroze koja uključuje Th1 i Th17 limfocite, kao i citokine koje ove ćelije proizvode. Navedeni su i opisani prvi klinički pokušaji primene parazita u kliničkoj terapiji obolelih od autoimunskih bolesti, među njima i multiple skleroze. Definisan je problem pronalaska novih terapijskih pristupa kod obolelih od hroničnih inflamatornih bolesti i potreba za pronalaskom definisanih molekula poreklom od parazita koji bi potencijalno mogli biti korišćeni u terapiji ovih oboljelih s obzirom da korišćenje živih parazita nije poželjan vid tretmana obolelih.

**Ciljevi rada** su jasno definisani i odnose se na ispitivanje uticaja ekskretorno-sekretornih produkata mišinih larvi *T. spiralis* (ES L1) na tok i modulaciju EAE-a kao i na ispitivanje mehanizama koji se nalaze u osnovi tog uticaja. Ciljevi doktorske teze bili su da se ispita da li različite doze dendritskih ćelija (DC) stimuliranih ES L1 antigenima, aplikovanih DA pacovima 7 dana pre indukcije EAE-a, dovode do značajne redukcije simptoma autoimunske bolesti, kao i da li direktno davanje ES L1 antigena *T. spiralis* DA pacovima dovodi do modulacije EAE-a i, ukoliko dovodi, da se odredi na koji način to zavisi od doze i frekvencije davanja antigena. Kao cilj rada definisano je i praćenje produkcije pro-inflamatornih (IFN- $\gamma$ , IL-17) i anti-inflamatornih citokina (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ), kao i procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T-ćelija (Treg)

na sistemskom nivou ( elije slezine) i na nivou ciljnog organa, tj. ki mene moždine ( elije infiltrata) i to u induktivnoj, efektornoj i fazi oporavka od EAE-a.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti ra eni na Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu. Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Eti ke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i Eti ke komisije Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu i sprovedene u skladu sa eti kim principima i smernicama za brigu o životinjama. Opisane su eksperimentalne životinje koriš ene u ogledima, kao i postupak dobijanja ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis*. Precizno je naveden postupak dobijanja i kultivacije dendritskih elija poreklom iz DA pacova, kao i indukovanja autoimunske bolesti EAE-a kod životinja. Detaljno je opisan postupak pra enja životinja i odre ivanje parametara bolesti, kao i metodologija odre ivanja koncentracije pro- i anti-inflamatornih citokina i procentualne zastupljenosti Foxp3<sup>+</sup> Treg elija u populaciji elija slezine i infiltrata ki mene moždine.

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

**Diskusija** predstavlja uporedan pregled dobijenih rezultata doktorske disertacije uz prikaz podataka drugih istraživanja. Dat je kriti ki osvrt na zna aj dobijenih rezultata i mogu nost primene novih vidova terapije autoimunskih bolesti.

**Zaklju ci** jasno prikazuju najvažnija saznanja koja su proistekla iz rezultata rada.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 279 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Ovo istraživanje je dalo doprinos razjašnjavanju mehanizama kojima ekskretorno-sekretorni antigeni parazita *T. spiralis* modifikuju imunski odgovor doma ina tokom autoimunske bolesti EAE-a, bilo direktnom aplikacijom ili primenom dendritskih elija koje su ovim antigenima stimulisane *in vitro*.

Potvr eno je da se dendritske elije nakon stimulacije ES L1 antigenima parazita *Trichinella spiralis* (DC/ES L1) mogu ozna iti kao tolerogene DC i njihova primena imala je inhibitorni efekat na razvoj EAE-a. Najve i uticaj na smanjenje težine bolesti ostvaren je

primenom doze od  $5 \times 10^6$  DC/ES L1. U osnovi fenomena redukcije simptoma autoimunske bolesti nalazi se polarizacija imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa praćena povećanom produkcijom IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$ , a smanjenom produkcijom proinflammatoryh citokina IFN- $\gamma$  i IL-17. Takođe, primena DC/ES L1 dovodi do povećanja procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u populaciji T-limfocita na sistemskom nivou, u slezini, kao i u CNS-u na nivou ciljnih organa.

Po prvi put je pokazano da i direktna aplikacija različitih doza ES L1 antigena parazita *T. spiralis* DA pacovima u različitim terminima pre početka autoimunske bolesti može dovesti do modulacije EAE-a na doznom zavisanoj osnovi. Najniža primenjena doza ES L1 (150  $\mu$ g), data u jednom terminu (7. dana) pre indukcije EAE-a, nije imala uticaj na tok bolesti. Doza od 150  $\mu$ g data u dva termina (14. i 7. dana), kao i doza od 250  $\mu$ g ES L1 data u jednom terminu pre indukcije EAE-a, dovele su do ublažavanja bolesti, ali je najveći efekat ostvaren primenom doze od 250  $\mu$ g koja je data u dva termina (14. i 7. dana) pre indukcije EAE-a što se manifestovalo kroz odlaganje početka bolesti, smanjenje incidencije, supresije razvoja kliničkih znakova i skraćivanje trajanja bolesti. Profilaktička primena izolovanih ES L1 antigena indukuje ubedljiv Th2 odgovor na sistemskom i lokalnom nivou, kao i anti-inflamatorni odgovor na nivou ciljnog tkiva, uz smanjenu produkciju pro-inflamatornih citokina, bez značajnog uticaja na promenu produkcije anti-inflamatornih i regulatornih citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ ) na sistemskom nivou. Direktna primena izolovanih antigena pokreće ekspanziju Treg ćelija, ali nekonvencionalnog CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> fenotipa na periferiji i na nivou ciljnih organa.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Iako su brojne studije analizirale uticaj infekcije helmintima na modulaciju eksperimentalnih modela autoimunskih bolesti, samo nekoliko njih je analiziralo uticaj izolovanih ekskretorno-sekretornih produkata helminata umesto primene živih parazita. Generalno je pokazano da infekcija helmintima kao i primena njihovih produkata dovode do polarizacije imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa. Ipak u literaturi je malo podataka o mehanizmima koji se nalaze u osnovi takve imunomodulacije

autoimunskih bolesti. U ovoj disertaciji smo pokazali da tretman produktima *T. spiralis*, bilo putem *in vitro* uticaja na sazrevanje DC ili direktnom aplikacijom eksperimentalnim životinjama, daje sličan efekat inhibicije toka EAE-a kao sama infekcija, pri čemu je uočena razlika na nivou aktivacije T regulatornih limfocita. Poznato je da indukcija Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija predstavlja jedan od mehanizama kojima tolerogene DC kontrolišu autoreaktivne T-limfocite. Na značaj Treg ćelija kao i povišenih nivoa citokina IL-10 i TGF- $\beta$ , u supresiji autoimunskih bolesti ukazale su brojne eksperimentalne studije. I naši rezultati pokazuju da Treg limfociti mogu biti uključeni u kontrolu, kako Th2 odgovora na parazitsku infekciju, tako i Th1 i Th17 odgovora odgovornih za nastanak EAE-a. Iako su eksperimentalne studije pokazale ublažavanje simptoma bolesti samo pri primenama malih doza tolerogenih DC, u našim nalazima najveća primenjena doza od  $5 \times 10^6$  DC/ES L1 imala je najjači uticaj na ublažavanje simptoma EAE-a. Profilaktička primena ES L1 antigena parazita *T. spiralis* imala je kapacitet da menja tok EAE-a putem preusmeravanja imunskog odgovora u pravcu Th2 na periferiji i u CNS-u, kao i putem aktivacije Treg ćelija. Aplikacija ES L1 antigena dovela je do pojave nekonvencionalnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija, koje su bile prisutne u visokom procentu i na periferiji i u centralnom nervnom sistemu tretiranih životinja. Supresija Th1/Th17 odgovora zapažena u tretmanu ES L1 antigenima može biti posledica pojačanog Th2 i anti-inflamatornog odgovora tj. povećane produkcije IL-4 i IL-10, jer je poznato da su citokini IL-4 i IL-10 medijatori koji mogu da spreče proliferaciju Th1 limfocita i produkciju pro-inflamatornih citokina. Rezultati dobijeni u ovom radu profilaktičkom primenom ES L1 antigena parazita *T. spiralis* koreliraju sa rezultatima autora koji su koristili totalni solubilni ekstrakt *T. spiralis* u modulaciji toka EAE-a kao i eksperimentalnog kolitisa. Ispitivanja sprovedena u ovom radu po prvi put su pokazala da aplikacija ES L1 antigena DA pacovima pre indukcije EAE-a dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti nekonvencionalnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-ćelija i na sistemskom i na lokalnom nivou. Ovakav efekat u modulaciji EAE-a pomoću parazita *T. spiralis* do sada je zapažen samo u tretmanu sa ES L1 antigenima dok aplikacija dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima, kao i infekcija mišim larvama parazita ne izazivaju ekspanziju Foxp3<sup>+</sup> populacije ćelija koja ne eksprimira CD25. Različite eksperimentalne studije su potvrdile da pored CD25<sup>+</sup> T-ćelija, imunosupresivno

dejstvo u *in vitro* i *in vivo* uslovima imaju i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> T- elije. Njihova regulatorna funkcija pokazana je i u studiji o protektivnom efektu ovih elija na nastanak dijabetesa, EAE-a i inflamatorne bolesti creva. Na osnovu naših, i rezultata drugih autora, može se zaključiti da populacija ovih elija doprinosi modulaciji EAE-a koja se postiže primenom metaboličkih produkata miši njih larvi *T. spiralis*. Imaju i u vidu da samo tretman sa ES L1 antigenima indukuje ekspanziju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> T- elija može se pretpostaviti da profilaktička promena ovih antigena doprinosi supresiji bolesti upravo putem aktivacije Foxp3<sup>+</sup> Treg elija ovog fenotipa, uz pokretanje Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

**Radovic I**, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Cvetkovic J, Mojsilovic S, Devic M, Sofronic-Milosavljevic L. 2015. Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunologic Research* 61: 312-325.

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis***“ dr Ivane Mitić predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju mehanizama kojima helminti modifikuju imunski odgovor tokom autoimunskih i drugih inflamatornih poremećaja što bi moglo da otvori mogućnost za njihovu dalju primenu u kliničkim studijama i eventualno terapiji multiple skleroze i drugih inflamatornih bolesti. U ovom radu po prvi put je pokazano da ne samo infekcija parazitom *T. spiralis* već i tretman njenim produktima, odnosno ES L1 antigenima, daje sličan efekat inhibicije toka autoimunske bolesti. Taj inhibični efekat je ostvaren kako indirektno, putem *in vitro* uticaja ES L1 antigena na sazrevanje DC koji su potom davane životinjama, tako i direktnom aplikacijom tih antigena životinjama pre indukcije EAE-a, pri čemu su uočene

određene razlike u mehanizmima inhibicije koje su se ogledale pre svega na nivou aktivacije T-limfocita kojima se pripisuju regulatorna svojstva.

Ova doktorska disertacija je urađena 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 i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

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

U Beogradu, 24.05.2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dušan Popadi

---

Dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević

---

Prof. dr Dragana Vučković

---

**Mentor:** Prof. dr Miloš Marković

---

**Komentor:** Dr Nataša Ilić

---