

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14. октобра 2016. године, прихваћен је извештај ментора др Драгане Марковић и др Предрага Вујовића о урађеној докторској дисертацији др мед. Ирине С. Масловарић, истраживача сарадника, под насловом „Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Драгана Марковић, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, др Предраг Вујовић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација др мед. **Ирине С. Масловарић**, под насловом „Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису“ садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, посвету, страну са подацима о институцији у којој је уређен експериментални део тезе и институцији у којој је теза финализована, захвалницу, стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (резиме, кључне речи, научна област, ужа научна област и УДК број), листу скраћеница, садржај, текст рада по поглављима, литературу, прилоге, биографију аутора, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу. Дисертација је написана на 118 странаца, садржи 26 табела (1 у поглављу Материјал и методе, 1 у поглављу Резултати и 24 у Прилозима), 26 слика (4 у Уводу, 1 у поглављу Материјал и методе, и 21 у поглављу Резултати) и 203 библиографске јединице. Пагинирани текст подељен је у 8 поглавља: Увод (23 странице), Циљеви рада (1 страница), Материјал и методе (11 страница), Резултати (21 страница), Дискусија (17 страница), Закључци (2 странице), Литература (19 страница) и Прилози (24 странице).

Анализа докторске дисертације:

Инфекција вирусом инфлуенце је честа вирусна инфекција која изазива епидемије на годишњем нивоу. Најефикаснији метод за спречавање и контролу ове болести је вакцинација. Иако се инфекција вирусом инфлуенце ретко повезује са

орган-специфичним и системским аутоимунским болестима, запажене су неуролошке аутоимунске манифестације после примене вакцине против инфлуенце.

Мултипла склероза (МС) је хронична, аутоимунска неуролошка болест која се чешће од других аутоимунских неуролошких болести доводи у везу са вакцинацијом али уверљиви докази о утицају вакцинације против грипа на појаву и развој МС не постоје. Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ) је најчешће коришћен животињски модел за изучавање механизма настанка и развоја МС јер показује многе заједничке клиничке и патофизиолошке карактеристике са хуманом МС. У својој докторској дисертацији Ирина Масловарић је, на мишјем експерименталном моделу, испитивала ефекат примене вакцине против грипа на 1) развој или погоршање клиничких знакова ЕАЕ, 2) појаву герминативних центара у периферним лимфним органима, 3) синтезу специфичних ауто-антитела и анти-инфлуенца антитела у серуму, 4) експресију молекула главног хистокompatibilног комплекса (енглески: *Major Histocompatibility Complex*, МНС) I и II класе у хороидном плексусу, 5) појаве лезија у хипокампадној регији мозга као делу лимбичког система и 6) на когнитивне функције експерименталних животиња, способност учења, памћења и просторне оријентације.

У поглављу **УВОД** кандидаткиња је у оквиру шест потпоглавља дала детаљан приказ савремених истраживања која се односе на проблематику докторске дисертације. Описана је структура вируса грипа, објашњени су разлози његове антигеске варијабилности и објашњена је антигенска композиција савремених вакцина против грипа. Приказани су резултати епидемиолошких студија које обухватају период од средине 70-тих година XX века до данас, масовније појаве нежељених ефеката вакцине које су садржавале одређене подтипове вируса као и студије које нису успеле да докажу повезаност примене вакцине против грипа са појавом неуролошких аутоимунских феномена. У посебном поглављу дат је приказ патофизиолошких основа МС са освртом на функцију антиген-презентујућих ћелија, за којим следи поглавље о улози инфекције вирусом грипа и вакцинације против грипа као могућим окидачима МС, знајући да су механизми настанка аутоимунског одговора на вакцинацију слични механизмима аутоимунских реакција које се могу јавити у току вирусне инфекције. Као последица МС јављају се моторна и сензорна дисфункција, промене у понашању и измењене когнитивне функције. С обзиром да већ у раној фази обољења почињу да се јављају клинички евидентни поремећаји когнитивних функција, у посебном потпоглављу описан је утицај вакцине против грипа на учење и памћење код оболелих од МС. *Bordetella pertussis* вакцина односно *pertussis* токсин може да појача одговор код одређених експерименталних аутоимунских болести изазваних на моделима глодара, као што је ЕАЕ модел, и у посебном потпоглављу ауторка је описала механизме којим ова грам-негативна бактерија, узрочник великог кашља, остварује свој адјувантни ефекат на изазивање ЕАЕ.

Кандидатиња је у поглављу **ЦИЉЕВИ РАДА** нагласила да је ова дисертација урађена са циљем расветљавања актуелног питања добробити примене вакцине против грипа, давањем свог одговора на питање да ли и у којој мери ова вакцина утиче на настанак, развој или погоршање аутоимунских болести централног нервног система. У складу са овим навео је да је циљ рада испитивање улоге вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса ЕАЕ кроз праћење: 1) индукције синтезе антитела на антигене вируса грипа; 2) индукције синтезе антитела на мијелин олигодендроцитни гликопротеин (енглески: *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, МОГ); 3) динамике развоја клиничких знакова болести; 4) појаве лезија у хипокампадној регији мозга; 5) експресије МНС молекула I и II класе у хипокампадној регији мозга; 6) морфолошких промена у ткиву периферних лимфних органа, слезине и ингвиналних лимфних

чворова, и експресије МНС молекула II класе и 7) ефекта вакцине на когнитивне функције (способности учења и памћења) код C57BL/6 мишева након вакцинације комерцијално доступном вакцином против грипа и индукције ЕАЕ након вакцинације. Једна од тема рада била је и испитивање ефекта различитих доза *Bordetella pertussis* вакцине као појачивача индукције ЕАЕ кроз праћење: 1) индукције синтезе антитела на MOG; 2) динамике развоја клиничких знакова болести; 3) појаве лезија у паренхиму и хипокампалној регији мозга и 4) експресије CD4 молекула и МНС молекула I и II класе у хипокампалној регији мозга.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у 6 потпоглавља. У првом потпоглављу су наведени коришћени имуногени и адјуванси. У другом потпоглављу је описан сој мишева који је коришћен у експериментима и начин гајења животиња пре и током експеримента. Такође наведено је да је експерименте одобрио одговарајући Етички комитет за заштиту добробити огледних животиња. У трећем потпоглављу описан је дизајн експеримента којим је испитиван ефекат вакцине против грипа на развој ЕАЕ. Детаљно је описан начин на који је индукован ЕАЕ (коришћењем MOG₃₅₋₅₅ пептида као имуногена, комплетног Фројндовога адјуванса и *pertussis* вакцине као додатног адјуванса), начин на који су праћени клинички знаци болести и начин праћења ефекта вакцине против грипа на когнитивне функције применом Морисовог теста воденог лавиринта (MWM). У четвртном потпоглављу описан је дизајн експеримента којим је испитиван ефекат различитих доза *Bordetella pertussis* вакцине као адјуванса на развој ЕАЕ. У потпоглављу „Методe“ детаљно су описане имуноензимске и имунохистохемијске методе коришћене у раду. ELISA тестовима који су развијени у лабораторији Биомедицинског центра Института Торлак детектовано је присуство серумских IgG антитела на хемаглутинин, антиген вируса инфлуенце, и антигене MOG-а. Са свим детаљима је објашњена имопероксидазна техника коришћена за детекцију МНС молекула I и II класе и MOG-а у ткиву мозга и МНС молекула II класе у слезини. Такође описана је и имунофлуоресцентна техника за детекцију МНС молекула II класе и CD4 молекула у ткиву мозга. За статистичку обраду података коришћени су софтверски пакети Microsoft Excel и OriginPro 8.

РЕЗУЛТАТИ ове дисертације су приказани у форми две целине, односно два потпоглавља. У првом потпоглављу приказани су резултати експеримената у којима је испитиван ефекат инактивисане вакцине против грипа на C57BL/6 мишеве код којих је ЕАЕ индукован MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Показано је да је након вакцинисања мишева комерцијално доступном вакцином против грипа успешно индукован ЕАЕ субкутаном апликацијом MOG₃₅₋₅₅ пептида. Код половине мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (са или без претходне вакцинације против грипа) нису детектовани клинички знаци ЕАЕ. У другој половини мишева детектовани су само благи клинички знаци. Резултати имуноензимског есеја показали су да је након вакцинације против грипа у серуму мишева регистрован повећан ниво антитела на *HA* антиген вируса грипа и да је титар ових антитела био значајно већи код мишева којима је након вакцинације био индукован ЕАЕ. Такође, имунозимским тестом је показано да су мишеви код којих је индукован ЕАЕ имали значајно већи титар анти-MOG антитела у односу на мишеве код којих није био индукован ЕАЕ и да вакцина против грипа није утицала на титар ових антитела. Хематоксилин-еозин бојењем ткива мозга код мишева код којих је индукован ЕАЕ уочене су мање промене типа лезија у хипокампусу. Код мишева који су примили вакцину против грипа пре индукције ЕАЕ примећено је додатно повећано присуство лезија. У хороидном плексусу мишева код којих је био индукован ЕАЕ детектоване су интензивно обојене МНС II позитивне ћелије које су биле бројније у односу на хороидни плексус мишева код којих није био индукован ЕАЕ. Снажнија експресија МНС II молекула је детектована код мишева код којих је вакцинација

против грипа претходила индукцији ЕАЕ. У хороидном плексусу мишева код којих је индукован ЕАЕ, независно од тога да ли су примили вакцину против грипа, детектују се слабо обојене појединачне МНС I позитивне ћелије. Поред тога што је регистрована на основу повећања титра анти MOG-антитела, активација хуморалне гране имунског одговора је регистрована и хистолошким анализом (хематоксилин еозин бојењем) секундарних лимфних органа, којом је у кортексу ингвиналних лимфних чворова и белој пулпи слезине мишева са ЕАЕ потврђено формирање герминативних центара. У ткиву слезине ових мишева детектован је већи број ћелија које су снажно експримирале МНС молекуле II класе.

Резултати MWM теста су показали да ни један од 40 мишева који су били укључени у експеримент, у периоду учења (пре имунизације вакцином против грипа) није показивао видљиве разлике у способности учења која би се огледала у немогућности савладавања теста и ови мишеви су несметано могли бити укључени у даљи експеримент. Код мишева који су примили вакцину против грипа као и код мишева код којих је индукован ЕАЕ, са или без претходне вакцинације против грипа, али који нису развили симптоме болести, нису уочене значајне промене когнитивних функција, способности учења, као ни губитак меморије. Код мишева који су примили вакцину против грипа и који су након индукције ЕАЕ развили симптоме болести, уочено је само транзитorno погоршање когнитивних функција. Ретроградном анализом показанао је да су ови мишеви имали нешто смањену способност учења и пре вакцинације и индукције ЕАЕ.

С обзиром да је ЕАЕ у првој групи експеримената индукован уз коришћење и *pertussis* вакцине као додатног адјуванса, који је могао да утиче на развој ЕАЕ, у другом потпоглављу приказани су резултати експеримената у којима је испитиван ефекат различитих доза *B. pertussis* вакцине на настанак и развој ЕАЕ. C57BL/6 мишеви код којих је ЕАЕ индукован само хомогенатом кичмене мождине и мишеви код којих је за изазивања ЕАЕ коришћена и адјувантна доза *pertussis* вакцине, развили су благе форме ЕАЕ, без уочених разлика између ове две групе. За разлику од адјувантне дозе, примена концентроване дозе *pertussis* вакцине изазвала је морталитет од 80%. У серумима свих мишева са индукованим ЕАЕ детектован је повећан титар анти-MOG антитела. У хипокампусу ових мишева детектована је реактивност са анти-MOG антителом. Такође, уочене су бројне и изразито обојене МНС II позитивне ћелије, док је реактивност са анти МНС I антителима била слаба. И експресија CD4 молекула је детектована у ћелијама хипокампадне регије. Примена адјувантне дозе *pertussis* вакцине није довела до промене у реактивности ћелија хипокампадне регије са анти-MOG, анти-МНС II, анти-МНС I и анти CD4 антителима. Добијени резултати су показали да адјувантна доза *pertussis* вакцине, коришћена у првој групи експеримената, није имала додатни утицај на развој ЕАЕ.

Резултати су приказани по поглављима и потпоглављима одговарајућих наслова, документовани су двадесет једном сликом и једном табелом, а појединачне вредности свих анализраних параметара, и резултати статистичке анализа налазе у поглављу Прилози. Иза сваког потпоглавља изведен је закључак, чиме аутор формира целине наговештавајући их као предмет разматрања у дискусији.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** резултати су детаљно разматрани са свих аспеката које намеће и даље отворено питање да ли је добробит примене вакцине против грипа код особа са аутоимунским болестима нервног система, уз посебан осврт на мултиплу склерозу, већа у односу на ризик. Свесна могућих ограничења примењене методологије, и уважавајући осетљивост експерименталног модела, ауторка своје резултате критички валоризује, али им не умањује значај. Сопствене резултате објашњава у светлу досадашњих резултата популационих студија код људи и резултата

добитијених на експерименталним животињским моделима. Кандидаткиња више него успешно повезује ове разнородне податке и њима подупије своја објашњења. У својој дискусији ауторка је размотрила све досадашње приступе проблемима који се везују за вакцинацију против грипа, а добијени резултати у овој дисертацији се подударају са резултатима највећег броја клиничких, епидемиолошких и експерименталних истраживања која не показују да је вакцина против грипа генерални имуностимулатор, односно стимулатор аутореактивних ћелија, и не показују да је она покретач или да има утицај на развој аутоимунских феномена у централном нервном систему.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња сумира резултате добијене током истраживања и као главни закључак истиче да промене уочене кроз праћење анализираних параметара код мишева код којих је индукован ЕАЕ и код мишева код којих је ЕАЕ индукован након вакцинације против грипа не показују да је примена вакцине била покретач или значајније утицала на развој ЕАЕ, а појединачно уочене разлике односиле би се на интраиндивидуалне разлике мишева унутар испитиваних група.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 203 библиографске јединице. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У **ПРИЛОЗИМА** су дате све појединачне нумеричке вредности и резултати статистичке анализе, који су у форми графика (слика) збирно приказани у поглављу Резултати. У прилозима 1 и 2 се налазе нумеричке вредности на основу којих су на сликама 4.2 и 4.3., по анализираним групама, приказани резултати имуноензимских тестова. У прилозима 3, 4, 5 и 6 су дати резултати МWM теста за сваког од 40 мишева који су били укључени у експеримент, као и резултати статистичке обраде података. Ови резултати су збирно приказани на сликама 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 и 4.16. У прилогу 7 су дате нумеричке вредности на основу којих су на слици 4.17, по анализираним групама, приказани резултати имуноензимског теста.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. M23. **Maslovarić I**, Vukov N, Stojković A, Kosanović D, Jovanova-Nešić K. Morphological changes in lymph nodes and spleen upon EAE induction in C57/BL/6 Mice. *Arch Biol Sci Belgrade*, 2013, 65: 1317-1322.
2. M23. Kosanović D, Stojković A, **Maslovarić I**, Vukov N, Jovanova-Nešić K. Influenza vaccine and learning in C57BL mice with an acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Central European Journal of Biology*, 2014, 9: 242-248.
3. M23. Stojković A, Kosanović D, **Maslovarić I**, Jovanova-Nešić K. Role of inactivated influenza vaccine in regulation of autoimmune processes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Neurosci*. 2014, 124: 139-147.
4. M23. Stojković A, **Maslovarić I**, Kosanović D, Vučetić D. Pertussis vaccine-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Translational Neuroscience*, 2014, 5(1), DOI: 10.2478/s13380-014-0206-x
5. M23. **Maslovarić I**, Stojković A, Kosanović D, Marković D, Ilic V, Jovanova-Nešić K. Vaccination and autoimmunity: influenza vaccination and association with multiple sclerosis. *Vojnosanitetski pregled*, 2016, прихваћен за штампу 14. септембра 2016.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација др мед. **Ирине С. Масловарић** под насловом „**Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису**“ представља свеобухватну савремену студију са значајним доприносом разумевању комплексности и даље отвореног питања могућег утицаја вакцине против грипа на развој аутоимунских феномена у централном нервном систему. По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог презентовања и поређења са литературним подацима, текст има све одлике квалитетне докторске дисертације и одговора на постављене циљеве истраживања. Комисија истиче да је кандидаткиња из добијених резултата своје докторске дисертације публиковала пет радова у међународним научним часописима са SCI листе.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидата Ирине С. Масловарић под насловом „Улога инактивисане вакцине против грипа у регулацији аутоимунских процеса у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису“ пред комисијом у истом саставу, др Драгана Марковић, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, др Предраг Вујовић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

КОМИСИЈА:

др Драгана, Марковиће, научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институт за медицинска
истраживања

др Предраг Вујовић, доцент,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет,

др Весна Илић, научни саветник,
Универзитет у Београду, Институт за медицинска
истраживања

У Београду, 17. октобар 2016. године.