

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.05.2024. године, на основу молбе ментора, др Биљане Божић Недељковић, редовног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета и др Ивана Пилиповића, вишег научног сарадника Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације дипломираног молекуларног биолога и физиолога Иване М. Пријић (рођ. Вујновић), истраживача-сарадника Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“ под насловом: „Полне специфичности у модуларном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, у саставу: др Мирјана Димитријевић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, др Небојша Јаснић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, и др Тања Лунић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

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 Иване М. Пријић (рођ. Вујновић) под насловом „Полне специфичности у модуларном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, написана је на 121 страни и садржи 2 табеле у оквиру поглавља Материјал и методе, 2 табеле, 18 графика и 28 слика

(које представљају приказ оригиналних резултата истраживања кандидаткиње) у склопу поглавља Резултати и 443 литературна навода. Основне целине ове дисертације су: Увод (14 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (16 страна), Резултати (41 страна), Дискусија (15 страна), Закључци (2 стране), Литература (32 стране; 443 референце). Дисертација садржи и насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са информацијама о менторима и члановима комисије (1 страна), захвалницу (1 страна), сажетке на српском и енглеском језику са кључним речима (2 стране) и садржај (5 страна). У оквиру прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет истраживања ове докторске дисертације био је испитивање могућности доприноса норадреналина, као крајњег медијатора симпатичког нервног система (СНС), развоју полних разлика у имунопатогенези аутоимунске неуроинфламације у моделу акутног експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ) код пацова соја *Dark Agouti* (ДА).

У поглављу **Увод**, које садржи пет потпоглавља, на систематичан и концизан начин изнет је преглед научних чињеница кључних за предмет проучавања докторске дисертације, које указују на оправданост и значај спроведених истраживања. У првом потпоглављу, под насловом *Полне разлике у имунском одговору* представљени су основни подаци о полним разликама у урођеном и адаптивном имунском одговору, и идентификовани кључни фактори који су за њих одговорни, укључујући, пре свега, деловање полних стероидних хормона, као и генетске факторе и чиниоце средине. Посебно је истакнут значај могућег посредног деловања полних хормона путем регулације функција СНС, као једног од кључних путева комуникације између централног нервног система (ЦНС) и имунског система. У потпоглављу *Катехоламини у регулацији имунског одговора* описани су основни механизми којима катехоламини, пре свега норадреналин, остварују модулацију имунског одговора, са посебним освртом на експресију α - и β -адреналинских рецептора (АР) на мембрани појединих типова имунских ћелија и

функцијски значај њихове активације. Акцент је стављен на ћелије имунског система са кључном улогом у патогенези ЕАЕ и мултипле склерозе, пре свега CD4+ (енгл. *cluster of differentiation*; CD) помоћничке Т (енгл. *T helper*; Th) ћелије, антиген-презентујуће ћелије (АПћ), макрофаге и микроглију. Осим тога, истакнут је и могући допринос дисфункције у комуникацији између СНС и имунског система развоју инфламаторних аутоимунских болести, укључујући мултиплу склерозу. У потпоглављу *Мултипла склероза и анимални модел, експериментални аутоимунски енцефаломијелитис* наведени су основни фактори ризика за развој мултипле склерозе, као и основне патолошке и клиничке карактеристике ове болести. Посебан део је посвећен молекуларним и ћелијским имунопатогенетским механизмима настанка мултипле склерозе, у којем је детаљно размотрен значај различитих типова имунских ћелија и резидентних ћелија ЦНС, њихових интеракција, као и медијатора које продукују, за развој инфламаторне каскаде и, коначно, демиелинизације и неуродегенерације у овој болести. Осим тога, у овом потпоглављу су представљене основне карактеристике ЕАЕ, као групе анималних модела који одсликавају различите клиничке, патолошке и имунолошке аспекте мултипле склерозе. Посебно детаљно су елаборирани кључни имунопатогенетски механизми класичног, „активног“ ЕАЕ, какав је коришћен у релизацији ове докторске дисертације. У потпоглављу *Полне разлике у мултиплој склерози и ЕАЕ*, изнети су подаци који указују на изражени полни диморфизам у ризику од обољевања и клиничким манифестацијама мултипле склерозе, што је повезано са полно-специфичним ефектима генетских, срединских и хормонских фактора ризика за развој ове болести. Такође, илустровано је да полне специфичности у интеракцијама наведених фактора доприносе и полним разликама у осетљивости експерименталних животиња на индукцију ЕАЕ, као и у току и тежини болести. Уз наведено, истакнут је и значај разлика у механизмима контроле оштећења и/или репарације ткива ЦНС у мултиплој склерози, као и њеним анималним моделима, за полни диморфизам у развоју и неуролошкој презентацији ових болести. У потпоглављу *Могући допринос имуномодулаторног деловања катехоламина полним разликама у мултиплој склерози и ЕАЕ* указано је на постојање поремећене симпатичке регулације у мултиплој склерози и ЕАЕ, као фактора који доприноси развоју ових болести. У светлу података о полном диморфизму у реактивности/организацији СНС и ефектима његове активације у имунском

систему, изложена је могућност да полне специфичности у имуномодулаторном деловању норадреналина доприносе полним разликама у развоју мултипле склерозе/ЕАЕ.

Полазећи од предмета истраживања ове докторске дисертације и података изложених у Уводу, у поглављу **Циљеви** јасно је дефинисано да је крајњи научни циљ овог истраживања био испитивање постојања полних разлика у имуномодулаторном деловању норадреналина на одговор CD4⁺ Т-лимфоцита у дренарајућим лимфним чворовима (дЛЧ) и развој аутоимунске инфламације у кичменој моздини младих одраслих пацова соја ДА код којих је имунизацијом хомогенатом сингене кичмене моздине индукован ЕАЕ, и, уколико се покаже да је његово деловање полно-специфично, идентификација целуларних и молекуларних механизма који стоје у његовој основи, ради бољег разумевања претходно показаног полног диморфизма у развоју и тежини ове болести. Ради остварења главног циља дефинисани су специфични истраживачки задаци:

1. (а) испитивање утицаја фармаколошке блокаде превасходно β -АР, а зависно од добијених резултата и α -АР, у пери-индуктивној/индуктивној фази ЕАЕ, на фенотипске и функцијске карактеристике АПћ и CD4⁺ Т-ћелија дЛЧ изолованих седмог дана након имунизације из женки и мужјака пацова; (б) испитивање ефеката и механизма деловања, блокаде β - или α -АР, у присуству и одсуству норадреналина, на пролиферацију и диференцијацију CD4⁺ лимфоцита у потенцијално патогене ћелије које синтетишу интерлеукин (ИЛ)-17 и фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (GM-CSF, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) у културама ћелија дЛЧ изолованих из пацова оба пола седмог дана након индукције ЕАЕ; в) утврђивање везе између потенцијалних полних разлика у ефектима блокаде АР са полним разликама у расположивости норадреналина и/или експресији АР на имунским ћелијама у дЛЧ.

2. (а) испитивање утицаја фармаколошке блокаде, пре свега, β -АР у ефекторској фази ЕАЕ, код мужјака и женки пацова, на фенотипске и функцијске карактеристике микроглије кичмене моздине, као и мијелоидних ћелија и Т-лимфоцита који инфилтрирају кичмену моздину на врхунцу болести, уз дефинисање механизма деловања; (б) утврђивање корелације између полних разлика у ефектима блокаде са потенцијалним полним диморфизмом у расположивости норадреналина и/или експресији АР на имунским ћелијама у кичменој моздини.

Поглавље **Материјал и методе**, које сачињава 13 потпоглавља, написано је прегледно и са довољно детаља неопходних за репродуковање експерименталних процедура. У потпоглављу *Огледне животиње* наведено је да су у раду коришћени женке и мужјаци младих адултних пацова (старости 3-4 месеца) високосродног соја ДА. Наводи се и да су сва истраживања спроведена у складу са смерницама директиве Европске комисије и Савета Европе 2010/63/ЕУ о заштити животиња које се користе у научне сврхе и Правилника за рад са експерименталним животињама Института „Торлак“, а уз одобрење Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије. У потпоглављу *Експериментални протокол* детаљно су описани експериментални системи који су коришћени. Истакнуто је да је истраживање реализовано у оквиру две велике експерименталне целине, које су за циљ имале: (1) утврђивање значаја периферног имуномодулаторног деловања норадреналина за полне разлике у механизмима активације аутореактивних Т-ћелија у дЛЧ и покретања примарног (ауто)имунског одговора, и (2) испитивање значаја централног имуномодулаторног деловања норадреналина за полне разлике у механизмима уласка аутореактивних Т-ћелија у кичмену мождину, њихове реактивације, као и контроле инфламације у овом органу. У оквиру целине (1), спроведене су две групе експеримената. У првој групи експеримената, пацови оба пола су подвргнути третману пропранололом (неселективним антагонистом β -АР) или физиолошким раствором *in vivo* током пери-индуктивне/индуктивне фазе ЕАЕ, односно од дана индукције („нулти“ дан) до дана жртвовања, 7. дана после индукције (д.п.и.) ЕАЕ, када су изоловане мононуклеарне ћелије дЛЧ у сврху испитивања њихових фенотипских и функцијских карактеристика. У другој групи експеримената су испитани *in vitro* ефекти пропранолола на фенотипске и функцијске карактеристике ћелија изолованих из дЛЧ женки и мужјака пацова 7. д.п.и. ЕАЕ. Целина (2) је подразумевала експерименте у којима је код пацова оба пола примењиван пропранолол или физиолошки раствор *in vivo* током ефекторске фазе ЕАЕ, односно од 10. д.п.и. ЕАЕ до потпуног опоравка/жртвовања на врхунцу болести (14. д.п.и. ЕАЕ). У овој временској тачки су анализирани фенотипске и функцијске карактеристике микроглије кичмене мождине, као и CD4⁺ Т-ћелија и мијелоидних ћелија које инфилтрирају овај орган. За утврђивање разлика у синтези/концентрацији норадреналина

и експресији AP у лимфним чворовима и кичменој моздини женки и мужјака DA пацова током развоја EAE, коришћене су нетретиране имунизоване (жртвоване у индуктивној фази или на врхунцу EAE), као и здраве неимунизоване животиње оба пола. Такође, дат је детаљан преглед основних експерименталних процедура и методологије коришћене у реализацији наведених експерименталних задатака, као и планираних анализа. У потпоглављу *Експерименталне процедуре* описани су начини индукције EAE, праћења неуролошке слике имунизованих животиња и спровођења *in vivo* третмана пропранололом. Животиње су имунизоване интрадермалним убризгавањем емулзије хомогената сингене кичмене моздине у комплетном Фројндовом адјувансу, уз супкутану примену суспензије инактивираних бактерије *Bordetella pertussis* у физиолошком раствору, у задњу десну шапу. Објашњен је и начин праћења неуролошке слике имунизованих животиња уз тумачење коришћене скале и праћених параметара болести. Наведен је образац давања пропранолола/физиолошког раствора пацовима, супкутано, два пута дневно, уз образложење коришћене дозе пропранолола од 10 mg/ml физиолошког раствора/kg телесне масе животиње. У потпоглављу *Реагенси, раствори и антитела* наведени су сви коришћени реагенси, раствори и хемикалије, укључујући табеларне приказе антитела и секундарних реагенаса коришћених за анализу антигена проточном цитофлуориметријом, као и есеја коришћених за мерење експресије информационе рибонуклеинске киселине (иРНК) методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *quantitative real-time polymerase chain reaction*; RT-qPCR). У потпоглављу *Изоловање моноклеарних ћелија* описан је поступак изоловања моноклеарних ћелија лимфних чворова и кичмене моздине, као и магнетног издвајања мијелоидних CD11b+ ћелија кичмене моздине. У потпоглављу *Одређивање концентрације норадреналина методом HPLC* описани су принципи функционисања течне хроматографије под високим притиском, и протоколи за припрему узорака ћелија дЛЧ и ткива дЛЧ и кичмене моздине, и за одређивање концентрације норадреналина у њима. У потпоглављу *Културе ћелија* описани су протоколи за стимулацију ћелија дЛЧ и кичмене моздине ради испитивања продукције цитокина, и испитивања ефеката агониста (артеренол) и/или антагониста β- (пропранолол), односно α-AP (празосин), у културама моноклеарних ћелија дЛЧ. У потпоглављу *Анализа капацитета за фагоцитозу/ендоцитозу* наведени су поступци за

испитивање фагоцитозе честица латекса и анализу ендоцитозе декстрана, који су коришћени ради одређивања способности микроглије за фагоцитозу/ендоцитозу. У потпоглављу *Тест за испитивање миграције антиген-презентујућих ћелија* описана је процедура за праћење миграције АПѠ са места имунизације у дЛЧ. У потпоглављу *Проточна цитофлуориметрија* наведени су поступци за припрему узорака за испитивање експресије мембранских и унутарћелијских антигена методом проточне цитофлуориметрије, као и анализу пролиферације CD4⁺ лимфоцита из култура ћелија дЛЧ. Описани су принципи рада проточних цитофлуориметара, као и начин анализе узорака, уз употребу одговарајућих контрола. У потпоглављу *Одређивање концентрације цитокина ELISA методом* наведени су поступци за мерење концентрације цитокина ИЛ-17А и ИЛ-2 у супернатантима култура моноклеарних ћелија дЛЧ методом ензимске имуноадсорпције (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA), а објашњен је и принцип на којем се заснива ова техника. У потпоглављу *Испитивање експресије гена методом RT-qPCR* објашњен је принцип функционисања ове методе, описани су поступци припреме узорака и изолације укупне РНК из ткива и ћелија дЛЧ и кичмене мождине, а затим и превођења укупне РНК у комплементарну ДНК. Описани су и начин припреме узорака за ланчану реакцију полимеразе у реалном времену, услови реакције и начин анализе резултата коришћењем β-актина као референтног гена. У поглављу *Статистика* је наведено да је за статистичку обраду података при тестирању утицаја пола и болести/третмана/услова култивације на испитиване параметре, коришћена метода двофакторске анализе варијансе уз примену Бонферонијевог теста за накнадна поређења, док је постојање полних разлика у експресији тирозин-хидроксилазе и АР у CD4⁺ Т-лимфоцитима и CD11b⁺ ћелијама дЛЧ испитивано употребом Студентовог т-теста. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка, а вредност $p \leq 0,05$ је сматрана статистички значајном.

Поглавље **Резултати** је организовано у седам потпоглавља. У потпоглављу *Утицај третмана пропранололом у пери-индуктивној/индуктивној фази ЕАЕ на развој болести код женки и мужјака пацова* су изнети резултати који показују да третман ДА пацова пропранололом у пери-индуктивној/индуктивној фази ЕАЕ смањује инциденцу и одлаже почетак болести код пацова оба пола, али израженије смањује тежину болести, судећи

према смањењу максималног неуролошког знака, код мужјака него код женки пацова. Утврђено је да наведени третман пропранололом смањује величину мононуклеарног инфилтрата у кичменој мождини пацова оба пола у индуктивној фази болести, укључујући и садржај Th17+ ћелија у том инфилтрату, независно од пола. У потпоглављу *Утицај третмана пропранололом у пери-индуктивној/индуктивној фази ЕАЕ на (ауто)имунски одговор у дренарајућим лимфним чвороревима женки и мужјака пацова у индуктивној фази болести* описани су резултати добијени: (1) анализом промена у концентрацији норадреналина у ткиву и експресији β_2 -АР на ћелијама дЛЧ женки и мужјака ЕАЕ пацова, у односу на здраве контроле; (2) праћењем утицаја *in vivo* третмана пропранололом на фенотипске и функцијске карактеристике мононуклеарних ћелија које учествују у патогенези ЕАЕ у дЛЧ женки и мужјака пацова. Показано је да се концентрација норадреналина смањује, док се заступљеност ћелија које испољавају β_2 -АР повећава у дЛЧ током развоја ЕАЕ. При томе, веће вредности ових параметра уочене код здравих мужјака у односу на женке пацова показане су и 7. д.п.и. ЕАЕ. Утврђено је да третман пропранололом у пери-индуктивној/индуктивној фази смањује миграцију активираних, зрелих, АПћ са места имунизације у дЛЧ 7. д.п.и. ЕАЕ код пацова оба пола, али израженије код мужјака. То је вероватно последица израженијег смањења експресије CCR7 (енгл. *C-C motif chemokine receptor 7*) на овим ћелијама, као и експресије хемокина CCL19 (енгл. *chemokine (C-C motif) ligand 19*) и CCL21 у ткиву дЛЧ животиња мушког пола. Показало се да, упркос полно-специфичним ефектима на миграцију АПћ, третман пропранололом смањује заступљеност активираних и пролиферишућих ћелија међу конвенционалним Т-лимфоцитима, као и број Th17 лимфоцита, у дЛЧ, у истој мери код женки и мужјака пацова. У потпоглављу *In vitro* ефекти пропранолола на пролиферацију и диференцијацију CD4+ лимфоцита дренарајућих лимфних чворова женки и мужјака ЕАЕ пацова приказани су резултати испитивања пролиферативног капацитета и диференцијације CD4+ лимфоцита у потенцијално патогене Th17 лимфоците у култури мононуклеарних ћелија, изолованих из дЛЧ мужјака и женки пацова 7. д.п.и. ЕАЕ, и стимулираних митогеном, конканавалином А, или базним протеином мијелина, у присуству или одсуству норадреналина (артеренола) и/или пропранолола/празосина (антагониста α_1 -АР). Утврђено је да пропранолол *in vitro* повећава (1) заступљеност

пролиферишућих ћелија у оквиру CD4⁺ лимфоцита, стимулишући њихову синтезу и/или секрецију ИЛ-2, и (2) заступљеност Th17 и, потенцијално изузетно патогених, Th17 GM-CSF⁺ ћелија у субпопулацији CD4⁺ лимфоцита, повећавајући експресију ROR γ t (енгл. *retinoid-associated orphan receptor γ t*) у њима, директно или индиректно, стимулацијом експресије ИЛ-1 β и ИЛ-23 у АП \ddot{H} . Показано је да су ефекти пропранолола специфично посредовани β -АР, и одражавају синтезу норадреналина у ћелијама лимфних чворова, чији се број током развоја ЕАЕ повећава. Израженији ефекти пропранола на пролиферацију CD4⁺ лимфоцита, њихову експресију ИЛ-2 и ROR γ t, као и експресију поларизационих цитокина у АП \ddot{H} , у културама ћелија мужјака него женки пацова, највероватније јесу последица веће заступљености CD4⁺ Т-лимфоцита и АП \ddot{H} које експримирају β -АР, и CD4⁺ Т-лимфоцита који синтетишу катехоламин у дЛЧ мужјака пацова. У овом потпоглављу је приказано и да CD4⁺ Т-лимфоцити изоловани из дЛЧ пацова оба пола 7. д.п.и. ЕАЕ експримирају и α ₁-АР, а да блокада ових рецептора *in vitro* смањује пролиферацију CD4⁺ лимфоцита, као и заступљеност ИЛ-17⁺ ћелија у овој популацији, али да ефекти блокаде α ₁-АР нису полно-специфични. У потпоглављу *Утицај третмана пропранололом у ефекторској фази ЕАЕ на тежину болести код женки и мужјака пацова* описани су резултати истраживања које је обухватало женке и мужјаке пацова који су примали пропранолол или физиолошки раствор (контролне животиње) од 10. д.п.и. ЕАЕ. Показано је да третман пропранололом ублажава болест код пацова оба пола, али ефикасније код мужјака, судећи према трајању болести, максималном неуролошком знаку и индексу тежине болести. Израженије је смањена и величина мононуклеарног инфилтрата у кичменој моздини мужјака него женки пацова третираних пропранололом. У потпоглављу *Промене у концентрацији норадреналина у ткиву и експресији β ₂-АР на CD11b⁺ ћелијама кичмене мождине женки и мужјака ЕАЕ пацова* приказани су резултати који указују да се концентрација норадреналина у ткиву кичмене мождине смањује на врхунцу болести у односу на здраве неимунизоване животиње, и животиње у индуктивној фази болести, а да је вредност овог параметра већа код мужјака у односу на женке, код здравих животиња и током развоја ЕАЕ. Такође је показана експресија иРНК за β ₁-АР и β ₂-АР у CD11b⁺ ћелијама, превасходно микроглији, кичмене мождине женки и мужјака здравих пацова, која се смањује током развоја ЕАЕ. Полне разлике су запажене само у

експресији иРНК за β_2 -АР. Већа експресија овог гена показана је у CD11b+ ћелијама мужјака него женки пацова, код здравих пацова и ЕАЕ животиња током развоја болести. У потпоглављу *Утицај третмана пропранололом у ефекторској фази ЕАЕ на фенотипске и функцијске карактеристике ћелија микроглије у кичменој моздини женки и мужјака пацова на врхунцу болести* представљени су резултати који показују да третман пропранололом током ефекторске фазе ЕАЕ смањује број ћелија активираних микроглије у кичменој моздини пацова оба пола на врхунцу болести, али ефикасније код мужјака. Испитивањем механизма оваквог деловања, показано је да пропранолол ефикасније стимулише активност анти-инфламаторне сигналне осовине коју сачињавају хемокин CX3CL1 (енгл. *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*), хемокински рацептор CX3CR1 (енгл. *CX3C motif chemokine receptor 1*), транскрипциони фактор Nrf2 (енгл. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) и ензим HO-1 (енгл. *heme oxygenase 1*) у ћелијама микроглије мужјака него женки ЕАЕ пацова. Нађено је и да пропранолол, такође израженије код ЕАЕ пацова мушког пола, доводи до транскрипционе супресије ИЛ-6/Stat3 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 3*) сигналне осовине, делом стимулишући експресију гена за Socs3 (енгл. *suppressor of cytokine signaling 3*), у CD11b+ ћелијама кичмене моздине. Такође су представљени резултати који указују да третман пропранололом смањује експресију проинфламаторних цитокина/ензима, док повећава експресију анти-инфламаторних цитокина/ензима и подстиче способност микроглије за фагоцитозу и ендоцитозу, ефикасније код мужјака него код женки пацова на врхунцу болести. Конзистентно, примена пропранолола током ефекторске фазе ЕАЕ смањила је експресију хемокина CCL2, CCL19 и CCL21 у ткиву кичмене моздине и број мијелоидних ћелија у овом органу, истовремено подстичући развој анти-инфламаторног функцијског фенотипа ових ћелија, на врхунцу ЕАЕ. Сви наведени ефекти третмана су били израженији код мужјака него код женки ЕАЕ пацова. У потпоглављу *Утицај третмана пропранололом у ефекторској фази ЕАЕ на фенотипске и функцијске карактеристике Т-лимфоцита који инфилтрирају кичмену моздину женки и мужјака пацова на врхунцу болести*, описани су резултати који указују да третман пропранололом смањује инфилтрацију кичмене моздине CD4+ Т-лимфоцитима, њихову реактивацију, као и диференцијацију у изузетно патогене ћелије које истовремено продукују ИЛ-17,

интерферон- γ (ИФН- γ) и GM-CSF. Приказано је и да пропранолол смањује однос ИЛ-17+ ефекторских и регулаторних Т (Трег) ћелија у кичменој мождини на врхунцу ЕАЕ. Деловање третмана пропранололом у ефекторској фази ЕАЕ на Т-ћелијски одељак кичмене мождине било је израженије код мужјака него код женки пацова.

Поглавље **Дискусија** је организовано у три дела, у сагласности са представљеним резултатима. У оквиру прва два дела, на основу ефеката пропранолола и празосина *in vivo* и/или *in vitro*, кандидаткиња је представила детаљну анализу механизма којима норадреналин, посредством β - и α -АР, модулише развој примарног (ауто)имунског одговора CD4+ Т-лимфоцита у дЛЧ након индукције ЕАЕ. У трећем делу овог поглавља, у светлу *in vivo* ефеката пропранолола примењеног у ефекторској фази ЕАЕ, дискутовани су ћелијски и молекуларни механизми који стоје у основи доприноса централног деловања норадреналина, посредством β -АР, полним разликама у тежини болести. Сумирано, у овом поглављу, кандидаткиња је на детаљан, али јасан начин резимирала резултате своје докторске дисертације и критички их сагледала у светлу досадашњих сазнања. Кандидаткиња је кроз ову анализу показала детаљно познавање научне литературе из релевантних области истраживања, као и способност да логично и научно засновано интерпретира резултате добијене у експерименталним истраживањима.

У складу са постављеним циљевима докторске дисертације, а на основу резултата експерименталног истраживања и њиховог сагледавања у светлу релевантних и актуелних научних података, кандидаткиња је извела следеће **закључке**:

I Третман антагонистом β -АР пропранололом у пери-индуктивној/индуктивној фази ЕАЕ ефикаснији је у смањењу тежине неуролошког дефицита код мужјака него код женки пацова соја ДА

1. Третман пропранололом смањује инфилтрацију кичмене мождине моноклеарним ћелијама, укључујући и Th17 лимфоците, што се може повезати са: смањеном миграцијом АПЋ које су преузеле антиген са места имунизације у дЛЧ (што, макар делимично, одражава смањену експресију гена за CCL19 и CCL21 у њима) и, следствено, мањом заступљеношћу активираних CD11b+ АПЋ, па и активираних/пролиферишућих укупних CD4+ Т-лимфоцита и Th17 субпопулације Т-лимфоцита у дЛЧ.

2. Испитивања деловања пропранолола у култури ћелија дЛЧ показују да пропранолол повећава:
 - а) пролиферацију CD4⁺ лимфоцита, што се може повезати са израженијом стимулацијом синтезе и/или секреције ИЛ-2 у/из ових ћелија мужјака у односу на ћелије женки пацова;
 - б) заступљеност CD4⁺ лимфоцита који синтетишу ИЛ-17, укључујући и оне који синтетишу GM-CSF, што корелира с повећањем експресије гена који кодира ROR γ t, а као резултат деловања блокаде β -AP како директно на његову експресију у CD4⁺ лимфоцитима, тако и индиректно, повећањем експресије гена за ИЛ-1 β и ИЛ-23 у АПЋ.
3. Инхибиторни ефекти третмана пропранололом на миграцију АПЋ у дЛЧ и њихов активациони профил су израженији код мужјака него код женки пацова којима је индукован ЕАЕ, што се може повезати са већом концентрацијом норадреналина у ткиву дЛЧ мужјака, али су стимулаторни ефекти пропранолола на пролиферацију CD4⁺ лимфоцита и диференцијацију Th17 лимфоцита израженији у културама ћелија дЛЧ мужјака него женки пацова којима је индукован ЕАЕ, те се може претпоставити да овакви ефекти пропранолола не дозвољавају да до изражаја дођу последице полних разлика које су уочене у његовом деловању на миграцију АПЋ у дЛЧ ЕАЕ животиња.
4. Одсуство полних разлика у инхибиторним ефектима празосина, антагониста α_1 -AP, на пролиферацију CD4⁺ лимфоцита и њихову диференцијацију у ћелије које продукују ИЛ-17 у култури ћелија дЛЧ ЕАЕ животиња објашњава фокусирање даљих истраживања на испитивање утицаја норадреналина, посредством β -AP, на ћелије које учествују у патогенези ЕАЕ.
5. Одсуство полних разлика у деловању пропранолола на активацију/пролиферацију CD4⁺ лимфоцита и број Th17 лимфоцита у дЛЧ, указује да израженије смањење тежине неуролошке слике ЕАЕ код мужјака третираних пропранололом највероватније не зависи од полно-специфичних ефеката третмана на примарни (ауто)имунски одговор, већ од ефеката на нивоу циљног органа (кичмене мождине).

II Третман пропранололом у ефекторској фази ЕАЕ израженије ублажава тежину неуролошког дефицита код мужјака него код женки пацова соја ДА, што се може повезати са:

1. Ефикаснијом транскрипционом активацијом компоненти анти-инфламаторне Nrf2/НО-1 сигналне осовине (директним деловањем пропранолола, или индиректно, стимулацијом CX3CL1/CX3CR1 сигналног пута), као и смањеном експресијом компоненти ИЛ-6/Stat3 сигналне осовине, а повећаном експресијом гена за Socs3 (кључни регулатор ИЛ-6/Stat3 пута), у мијелоидним ћелијама (превасходно микроглији) кичмене мождине мужјака пацова на врхунцу болести, и следствено ефикаснијом стимулацијом њихове поларизације ка анти-инфламаторном/протективном фенотипу, судећи према смањеној експресији проинфламаторних (индуцибилна синтаза азот-моноксида, оксидаза никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфата, ИЛ-1 β), а повећаној експресији анти-инфламаторних (аргиназа 1, ИЛ-10, фактор трансформације раста- β) ензима/цитокина у мијелоидним ћелијама/микроглији и повећаној способности микроглије за фагоцитозу/ендоцитозу.
2. Ефикаснијим смањењем инфилтрације мијелоидних ћелија и Т-лимфоцита из циркулације у кичмену мождину мужјака пацова код којих је индукован ЕАЕ, што се може, макар делимично, приписати детектованом израженијем смањењу експресије гена за хемокине CCL2, CCL19 I CCL21 у ткиву кичмене мождине ових животиња.
3. Ефикаснијим усмеравањем диференцијације мијелоидних ћелија које инфилтрирају кичмену мождину мужјака пацова у ћелије анти-инфламаторног фенотипа (судећи према мањој заступљености ћелија које продукују ИЛ-1 β , а већој заступљености оних које продукују ИЛ-10 и фактор трансформације раста- β у овој популацији).
4. Ефикаснијим смањењем реактивације Т-лимфоцита који инфилтрирају кичмену мождину мужјака пацова, њихове диференцијације у ћелије које продукују ИЛ-17, укључујући и оне изразито патогеног ИФН- γ +GM-CSF+ фенотипа, што помера однос броја ИЛ-17+ Т-лимфоцита и Трег ћелија на страну Трег ћелија.
5. Већом концентрацијом норадреналина у ткиву и експресијом гена за β_2 -АР, кључни подтип β -АР у имунском систему, у мијелоидним ћелијама кичмене мождине мужјака

пацова, чему се могу приписати све претходно описане полне разлике у деловању пропранолола.

Резултати представљени у овој дисертацији истичу значај норадреналина пореклом из нервних влакана, али и имунских ћелија, који делује посредством β - и α_1 -АР на различите популације имунских ћелија у дЛЧ и кичменој мождини, за патогенезу ЕАЕ. При томе, ефекти посредовани β -АР се могу повезати са полним разликама у деловању норадреналина (израженији ефекти код мужјака), а добијени резултати указују да полним разликама у тежини болести превасходно доприносе полне разлике у деловању овог неуротрансмитера/хормона на резидентне мијелоидне ћелије у циљном органу (кичменој мождини).

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Резултати ове докторске дисертације су публиковани у три рада у међународним часописима, од чега два рада у истакнутим међународним часописима (M22) и један у међународном часопису (M23). Кандидаткиња је део резултата своје дисертације изложила у виду два саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу (M34) и једног саопштења на скупу националног значаја штампаног у изводу (M64).

B1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ivana Vujnović**, Ivan Pilipović, Nebojša Jasnić, Raisa Petrović, Veljko Blagojević, Nevena Arsenović-Ranin, Zorica Stojić-Vukanić, Jelena Đorđević, Gordana Lepasavić. Noradrenaline through β -adrenoceptor contributes to sexual dimorphism in primary CD4+ T-cell response in DA rat EAE model. Cellular Immunology 2019; 336:48-57. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.12.009. **(M22)**
<http://intor.torlakinstitut.com/handle/123456789/539>
2. Ivan Pilipović, **Ivana Vujnović**, Raisa Petrović, Zorica Stojić-Vukanić, Gordana Lepasavić. Propranolol impairs primary immune response in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroimmunomodulation 2019; 26:129-138. doi: 10.1159/000500094. **(M23)**
<http://intor.torlakinstitut.com/handle/123456789/541>
3. Ivan Pilipović, Zorica Stojić-Vukanić, **Ivana Prijić**, Nebojša Jasnić, Jelena Djordjević, Gordana Lepasavić. β -Adrenoceptor Blockade Moderates Neuroinflammation in Male and Female EAE Rats and Abrogates Sexual Dimorphisms in the Major

Neuroinflammatory Pathways by Being More Efficient in Males. Cellular and Molecular Neurobiology 2023; 43:1237-1265. doi: 10.1007/s10571-022-01246-z. (M22)
<http://intor.torlakinstitut.com/handle/123456789/622>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Ivana Vujnović**, Ivan Pilipović, Raisa Petrović, Zorica Stojić-Vukanić, Nevena Arsenović Ranin, Gordana Lepasavić. Propranolol influences EAE development by impairing antigen presenting cell migration into the draining lymph nodes. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, the Netherlands, September 2-5 2018. (M34)
<https://intor.torlakinstitut.com/handle/123456789/852>
2. Ivan Pilipović, **Ivana Prijić**, Zorica Stojić-Vukanić, Gordana Lepasavić. Sexual dimorphism in CX3CR1/Nrf2/HO-1 spinal cord axis affects therapeutic efficacy of β -adrenoceptor blockade in EAE rats. 6th European Congress of Immunology. Virtual Meeting, September 1-4 2021. European Journal of Immunology 2021, 51(S1), 1-448. (M34)
<https://doi.org/10.1002/eji.202170200>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима националног значаја

1. Ivan Pilipović, **Ivana Vujnović**, Raisa Petrović, Zorica Stojić-Vukanić, Nevena Arsenović Ranin, Gordana Lepasavić. Blokada β -adrenergičkih receptora polno dimorfno utiče na primarni odgovor CD4⁺ T-limfocita u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE). Naučni sastanak Društva imunologa Srbije, Svetski dan imunologije - 2018, SANU, Beograd, Srbija, 26. april 2018. Knjiga sažetaka, str. 27. (M64)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Иване М. Пријић (рођ. Вујновић), Б3033/2013, послата је дана 7. јуна 2024. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 7. јуна 2024. године.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 24%. Подударност са Internet Đuretić, Jasmina. "Influence of aging on immune response and neuroinflammation: research in experimental autoimmune encephalomyelitis", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2019 износи 8%, са nardus.mpn.gov.rs износи 3%, са Internet пет пута по 1%, а сви остали индекси подударности износе мање од 1%. Добијени индекси подударности односе се на лична имена, опште појмове и нашироко коришћене синтагме, називе, скраћенице цитокина и

испитиваних молекула, називе реагенаса, широко коришћене скраћенице, коришћење стандардних израза из области истраживања. Наведена преклапања краћих делова појединих различитих реченица нису повезана и не чине смислену целину.

Када се све изнето узме у обзир, а у складу са чланом 9 Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Иване М. Пријић (рођ. Вујновић), под насловом „Полне специфичности у модуларном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Иване М. Пријић (рођ. Вујновић), под насловом: „Полне специфичности у модуларном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, израђена је у потпуној сагласности са правилником добре научне праксе. Поштујући основне етичке принципе и научне стандарде при извођењу експеримената и изношењу резултата истраживања, кандидаткиња је показала добро познавање релевантне научне литературе, и способност да уочи проблем и дефинише одговарајући научни приступ за његово решавање, као и научних метода неопходних за научни рад у области њеног истраживања. Кандидаткиња је показала и значајан степен компетентности и инвентивности у интерпретирању резултата истраживања. Квалитет научних часописа и њихова релевантност за предмет истраживања, недвосмислено говоре о значају одабраног предмета истраживања и добијених резултата. Резултати су публиковани у три рада у међународним часописима, од чега су два рада у истакнутим међународним часописима (M22) и један у међународном часопису (M23). Кандидаткиња је део резултата своје дисертације изложила у виду два саопштења на скуповима међународног значаја (M34) и једног саопштења на скупу националног значаја (M64) штампаних у изводу.

На основу свега претходно изложеног Комисија утврђује да је кандидаткиња успешно испунила све постављене циљеве, а да добијени резултати представљају оригиналан и значајан допринос важној и актуелној области истраживања каква је неуроимунологија.

Последично, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета да прихвати извештај Комисије о докторској дисертацији Иване М. Пријић (рођ. Вујновић), под насловом: „Полне специфичности у модуларном деловању норадреналина на CD4+ Т-лимфоците у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, и да га упуту на даљу процедуру усвајања Већу области природних наука Универзитета у Београду ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске тезе.

КОМИСИЈА:

У Београду, 10.06.2024. године

др Мирјана Димитријевић, научни саветник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Небојша Јаснић, ванредни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Тања Лунић, научни сарадник,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет