

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -
БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.09.2024. године, на основу молбе ментора, др Маје Живковић, научног саветника, Института за нуклеарне науке “Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Милана Б. Стефановића, истраживача сарадника, Института за нуклеарне науке “Винча” – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом: **„Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склерозе “**, у саставу: др Александра Станковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке “Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду; др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду; др Евица Динчић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет одбране у Београду.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Веће научних области природних наука је на седници одржаној 29.04.2021. дало сагласност на одлуку Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, о прихватању теме докторске дисертације Милана Стефановића под насловом: „Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склерозе .“

Експериментални део докторске дисертације је урађен у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну гентику, Института за нуклеарне науке “Винча” – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација је написана на укупно 76 страна. Текст дисертације је формативан и организован у складу са инструкцијама у упутству о облику и садржају докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду. Теза садржи све неходне делове: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и члановима комисије (1 страна), сажетак на српском и енглеском језику (2 стране), скраћенице стручних појмова (3 стране), садржај (2 стране), увод (13 страна, од нумерисане стране 1 закључно са страном 13), хипотезу и циљеве (1 страна, стр. 14), материјал и методе (8 страна, стр. 14-21), резултате (20 страна, стр. 21-40), дискусију (8 страна, стр. 41-48), закључке (1 страна, стр. 48), литературу (21 страна, стр. 49-69), биографију аутора (1 страна), изјаву о ауторству (1 страна), изјаву о истовестности штампане и електронске верзија докторског рада (1 страна), изјаву о коришћењу (2 стране). Докторат садржи 13 графикана. Графики преузети из других извора су правилно цитирани према оригиналном извору. Докторат садржи 7 табела. У листи литературе је наведено 183 литературна извора. Све референце су цитиране униформно, Харвард стилем цитирања.

Анализа докторске дисертације

Кандидат Милан Стефановић је у докторској дисертацији изучавао асоцијацију потенцијално регулаторних варијанти *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 и *IKZF3* rs12946510 и експресије гена *ORMDL3*, *GSDMB*, *IKZF3* и *IL2RA* са настанком мултипле склерозе (МС) и релеватним демографским и клиничким карактеристикама болести, односно тежином болести. Испитана је и потенцијално регулаторна улога генетичких варијанти у експресији одабраних циљних гена у МС.

Поглавље **Увод** (стр. 1-13) је организовано у 10 целина које описују општу тематику болести и ужу тематику везану за одабир варијанти, карактеристике варијанти које су анализирани и гена чија је експресија испитана у крви пацијената са МС и здравих испитаника. У првом поднаслову (стр. 1), *Неуропатологија мултипле склерозе*, кандидат описује најважније познате карактеристике оштећења ткива централног нервног система (ЦНС) које настаје услед МС са посебном пажњом посвећеној инфламацији у ЦНС. У оквиру друге целине (стр. 2), *Ћелије адаптивног имунског система у мултиплој склерози*, кандидат је описао карактеристике и улоге

најзначајнијих типова ћелија адаптивног имунског система у МС, описујући МС као болест у чијој основи је поремећај у хомеостазу адаптивног имунског система. У трећој целини *Клиничке карактеристике мултипле склерозе* (стр. 2-3) кандидат је описао основне клиничке параметре који су битни за дијагностиковање, праћење прогресије и тежине болести и који су анализирани у докторској дисертацији. У четвртој целини (стр. 3-4) *Епидемиологија мултипле склерозе* описане су најважнија сазнања о епидемиологији болести укључујући демографске и срединске факторе битне за настанак МС, као што су значај географске ширине, количине витамина Д у серуму, женски пол и године старости на почетку болести. У петој целини (стр. 4-5), *Генетика мултипле склерозе*, дат је преглед литературе и приступа у изучавању генетике компоненте МС, који се мењао у последњих 20 година, обзиром на то да је у питању комплексна болест у чији је настанак и прогресију укључен велики број гена. Истакнут је до сада највише анализиран генски локус ХЛА (HLA) који је реплициран у великом броју популација као значајан за настанак МС. Дат је осврт на проблем истраживања појединачних гена кандидата који је најчешће примењиван до почетка 2000 тих, а који није резултовао довољном репродукцибилношћу у изучавању гена ван ХЛА локуса у различитим популацијама и испитиваним групама. Кандидат наводи и новије најзначајније студије које су довеле до проналаска већег броја генских локуса ван ХЛА региона развојем и употребом нових технологија за анализу великог броја генетичких варијанти, приступом анализе целокупног генома (GWAS). У шестој целини (стр. 5-6), *Значај тачкастих генетичких варијанти у мултиплој склерози и процена њихове узрочне везе са МС-ом*, наведени су приступи за анализирање узрочне везаности тачкастих генетичких варијанти, појам хаплотипа и генетичка неравнотежа везаности наслеђивања (eng. Linkage Disequilibrium, LD). Истакнуто је који су параметри битни за разумевање генетичких података у комплексним болестима попут МС и истакнут је значај развоја и примене алгоритама за прецизније одређивање вероватноће да је генетичка варијанта узрочна за одређени фенотип. Посебно је објашњена метода за прецизно мапирање тачкастих генетичких варијанти (eng. Single Nucleotide polymorphism, SNP), која је базирана на интеграцији информација из GWAS за аутоимуне болести и Бајесовој интерпретацији узрочности, пробабилистичка интерпретација узрочних тачкастих генетичких варијанти (eng. Probabilistic Interpretation of Causal SNPs, PICS) чији су резултати битни за полазну основу доктората. У седмој целини (стр. 6-7), *Утицај тачкастих генетичких полиморфизама на експресију гена у МС*, наведене су регулаторне карактеристике полиморфизама, уз

релевантне базе података, који утичу на експресију гена. У осмој и деветој целини (стр. 7-10) описани су гени *IL2RA*, *IFI30* и *IKZF3*, и полиморфизми у њима као и значај за истраживања у МС. Описан је механизам на основу кога је постављена хипотеза о регулаторној улози испитаних варијанти у МС. У десетој целини (стр. 10-13) описан је значај хромозомског региона 17q12-21 и гена *ORMDL3*, *GSDMB* и *IKZF3* и разлози за њихово истраживање у МС. У уводу су графички (Графикон 1-3) представљене позиције генских локуса и полиморфизама у њима.

Циљеви докторске дисертације су јасно и таксативно наведени и приказујемо их у целости (преузето из докторске дисертације):

1. Испитивање асоцијације одабраних варијанти *IL2RA*, *IFI30* и *IKZF3* са настанком МС, тежином и прогресијом болести, анализом варијанти у групи здравих индивидуа и пацијената са МС у популацији Србије.
2. Анализа нивоа експресије *ORMDL3*, *GSDMB* и *IKZF3* у МЋПК и концентрације солубилног CD25 у плазми периферне крви код пацијената са МС и асоцијације са клиничким параметрима болести.
3. Испитивање утицаја варијанти *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 и *IKZF3* rs12946510 на експресију гена *ORMDL3*, *GSDMB* и *IKZF3* код здравих индивидуа и пацијената са МС.

Поглавље **Материјал и методе** је подељено у 11 одвојених целина, у којима су детаљно описане експерименталне методе молекуларне генетике коришћене у реализацији наведених циљева. Кандидат је детаљно приказао поступке екстракције укупне ДНК и РНК из периферних мононуклеарних ћелија (МЋПК), синтезу комплементарне ДНК реакцијом реверзне транскрипције и релативну квантификацију експресије иРНК циљних гена. Наведена је и методологија генотипизације одабраних полиморфизама. За анализу концентрације протеина такође је наведена методологија. У оквиру статистичких метода наведени су таксативно сви тестови који су коришћен при обради добијених резултата. Материјал и методе су детаљно наведени.

Поглавље **Резултати** у оквиру докторске дисертације је уобличено у 9 целина. Резултати су приказани у табелама и на сликама и сви прикази су пропраћени одговарајућим легендама и објашњењима и уклопњени у целину са текстуалним описом резултата докторске дисертације. Кандидат је нагласио које табеле и/или сликовни прикази су у идентичном формату приказани на енглеском језику у публикацијама које су проистекле из ове докторске дисертације.

Први део (стр. 21-25), обухвата резултате демографских и клиничких података испитаних група. Други део (стр. 25-27), обухвата резултате асоцијације генетичких варијанти *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 и *IKZF3* rs12946510 са ризиком за настанак МС. Трећи део (стр. 27-29) обухвата резултате асоцијације генетичких варијанти са клиничким параметрима МС. Четврти део (стр. 29-30) обухвата резултате асоцијације релативне експресије иРНК за три одабрана гена *ORMDL3*, *GSDMB* и *IKZF3*. Пети део обухвата резултате асоцијације генетичких варијанти *IKZF3* rs12946510, *IL2RA* rs2104286 и *IFI30* rs11554159 са релативном експресијом гена *ORMDL3*, *GSDMB* и *IKZF3* у МТПК пацијената са МС-ом и здравих контрола (стр.31-34). Шести део обухвата резултате корелације нивоа релативне експресије иРНК за три одабрана гена са клиничким и демографским параметрима МС (стр. 35-36). Седми део обухвата резултате комбинованог утицаја *IKZF3* генотипа, пола, фазе болести, и терапије на нивое релативне експресије иРНК за три одабрана гена (стр. 36-39). Осми део обухвата резултате асоцијације концентрације ЦД25 (CD25) у крвној плазми са терапијом(стр. 39-40). Девети део наводи резултате корелације концентрације ЦД25 у крвној плазми са клиничким параметрима (стр. 40).

Дискусија (стр. 41-48) је детаљна и поред адекватних објашњења кандидат даје и критички осврт на сопствене резултате изнете у докторској дисертацији у светлу других резултата из литературе. Кандидат наводи адекватне, савремене научне радове при дискутовању резултата. Јасно је указао и на постојање извесних ограничења студије, али и изнео предлоге за будућа истраживања у научном пољу које је предмет доктората.

На основу резултата докторске дисертације, кандидат је извео закључке који су представљени јасно и таксативно. **Закључци** ове докторске дисертације су били следећи (преузето у целости из докторске дисертације):

1. Варијанте *IFI30* rs11554159 и *IKZF3* rs12946510 нису препознате као значајне за настанак МС-а у испитаном узорку пацијената и здравих испитаника из популације Србије. Утврђено је да је варијанта *IL2RA* rs2104286, повезана са настанком МС-а, где ређи алел испољава протективан ефекат.
2. Утврђен је комбиновани ефекат варијанте *HLA-DRB1*15:01* и варијанте *IFI30* rs11554159, ређег хомозиготног генотипа АА, на прогресију МС-а.

3. Смањена експресија иРНК гена *ORMDL3* и *GSDMB* у МЋПК је маркер релапсно ремитетне МС, а ниво експресије гена *IKZF3* у МЋПК позитивно корелира са параметром неуролошког дефицита.
4. Утврђено је да варијанта *IKZF3 rs12946510* испољава ефекат модификације нивоа транскрипције гена *ORMDL3* и *GSDMB* у МЋПК МС пацијената са РРМС формом болести.
5. Варијанта *IKZF3 rs12946510* и имуномодулаторна терапија Интерферон-ом β испољавају комбиновани ефекат на експресију гена *GSDMB* у МЋПК РРМС пацијената који су у ремисији.
6. У анализараној групи пацијената из популације Србије, концентрација CD25 у периферној крви не представља информативан маркер прогресије МС-а.

При писању докторске дисертације, кандидат је цитирао 183 литературна извора који су релевантни за научну област докторске дисертације. Сви коришћени литературни извори су правилно и уједначеним стилем наведени у тексту. Комплетан попис коришћене литературе је дат у оквиру целине **Литература**.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Stefanović, M., Životić, I., Stojković, L., Dinčić, E., Stanković, A. and Živković, M., 2020. The association of genetic variants *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 and *IKZF3* rs12946510 with multiple sclerosis onset and severity in patients from Serbia. *Journal of Neuroimmunology*, 347, p.577346; IF₂₀₂₀=3.478 **M22**
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577346>
2. Stefanović, M., Stojković, L., Životić, I., Dinčić, E., Stanković, A. and Živković, M., 2024. Expression levels of *GSDMB* and *ORMDL3* are associated with relapsing-remitting multiple sclerosis and *IKZF3* rs12946510 variant. *Heliyon*, 10(3).
IF₂₀₂₄=4.0 **M22**
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25033>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Stefanović, M., Životić, I., Dinčić, E., Smiljana, K., Stojković, L., Stanković, A. and Živković, M., 2019. Association of *IFI30* rs11554159 with severity of relapse

remitting multiple sclerosis in patients from Serbia. *VI Congress of the Serbian genetic society: Book of abstracts* (pp.107-107)

M34

2. Stefanović, M., Stojković, L., Đurić, T., Stanković, A., Dinčić, E. and Živković, M., 2023. association of *IL2RA* rs2104286 variant with adaptive immunity gene expressions located in 17q12-21 chromosomal region in multiple sclerosis patients. *In CoMBoS2—the Second Congress of Molecular Biologists of Serbia: Book of abstracts* (pp. 69-69).

M34

Провера оригиналности докторске дисертације

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, ментор је констатовао да утврђено подударнање текста износи 11%. Овај степен подударности последица је преклапања назива на енглеском и српском језику у оквиру појашњења порекла скраћеница коришћених у тексту и општих места и података, назива инструмената или метода коришћених током израде студије, као и претходно публикованих резултата истраживања који су проистекли из дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Већина преклапања по сегментима износе 1% или мање од 1%.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, ментор је оценио да извештај указује на оригиналност докторске дисертације.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидата Милана Стефановића под насловом: „Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склерозе“ представља оригиналан допринос у разумевању генетике и молекуларне биологије комплексног хроничног обољења, мултипле склерозе.

Кандидат је анализирао повезаност потенцијално регулаторних варијанти са ризиком за настанак мултипле склерозе, тежином клиничке слике и формом болести. Испитан је и утицај варијанти rs2104286, rs11554159 и rs12946510 на експресију иРНК гена *ORMDL3*, *GSDMB* и *IKZF3*. Резултати експерименталних истраживања су описани

у 2 научна рада која су објављена у међународним часописима М22 категорије и у 2 конгресна саопштења на међународним скуповима штампаним у изводу.

Комисија је утврдила да је у питању оригинално и савремено научно дело са озбиљним пристуом у изучавању генетике и молекуларне биологије МС. Увод јасно описује општу проблематику мултипле склерозе, укључујући неуропатаологију, патолошко понашање адаптивном имунског система, клиничке карактеристике и генетику МС. Осим опште проблематике, увод концизно и прецизно уводи у ужу тему истраживања кроз опис развоја нових приступа за дефинисање узрочних варијанти у комплексним болестима човека, као што су робустни а специфични алгоритми процене каузалности и функционалности генетичких варијанти, опис утицаја тачкастих полиморфизама на експресију гена у МС и опис појединачних потенцијално регулаторних варијанти и одабраних циљних гена који су били тема докторске дисертације.

У овој дисертацији, кандидат је користио познате и доказане експерименталне методе. Експерименталне методе и статистичке анализе добијених резултата су описане прецизно и довољно да се експериментална процедура понови.

Кандидат је описао резултате своје дисертације на јасан и упечатљив начин који не оставља простора за двосмислену интерпретацију добијених експерименталних резултата. Резултати тестирају наведене хипотезе дисертације и испуњавају описане циљеве.

Кандидат је зрело и непристрасно критички интерпретирао резултате своје дисертације у складу са најновијим стањем у литератури. Дискусија омогућава позиционирање резултата дисертације у адекватан контексту у области генетике и молекуларне биологије МС. Кандидат је у својој дискусији указао на потенцијалан значај одабраних варијанти и експресија циљних гена на ризик за настанак МС и прогресије болесту у популацији из Србије. Дискусија истиче тренутне недостатке у разумевању тематике и упућује на будуће правце научних истраживања.

Именована Комисије предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата Милана Б. Стефановића под називом: „Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склерозе“ и тиме омогући кандидату да одбрани докторску дисертацију.

У Београду, 24.09.2024. године

КОМИСИЈА:

др Александра Станковић, научни саветник,
Институт за нуклеарне науке “Винча” –
Институт од националног значаја за Републику
Србију, Универзитет у Београду

др Горан Брајушковић, редовни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Евица Динчић, редовни професор,
Медицински факултет, Универзитет одбране у
Београду