

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-178 од 15.05.2023.године, именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата Васиљевић др Милоша под насловом "Имуномодулацијска својства природних целулозних нанокристала"

(у даљем тексту: Комисија)¹ у сљедећем саставу:

1. Академик Проф. др Миодраг Чолић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет у Фочи, предсједник Комисије.
2. Проф. др Драгана Вучевић, научни савјетник, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, члан Комисије.
3. Проф. др Сениша Ристић, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.
4. Проф. др Дејан Бокоњић, редовни професор, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.
5. Доц. др Иван Радић, доцент, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.

Комисија је прегледала и оцијенила докторску дисертацију и о томе подноси Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву следећи

ИЗВЈЕШТАЈ **о оцјени урађене докторске дисертације**

1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области	Урађена докторска дисертација, којом су испитивана имуномодулацијска својства природних целулозних нанокристала (енгл. <i>cellulose nanocrystals</i> , CNC), обрађује актуелну проблематику која је са научног аспекта веома значајна. Наноцелулоза (енгл. <i>nanocellulose</i> , NC) привлачи доста пажње посљедњих неколико година, посебно када је у питању биомедицинска примјена. У том смислу су од значаја њена примјена у виду антибактеријског средства, потом у областима ткивног инжињеринга, зарастања рана, доставе лијекова и терапије тумора. Без обзира на постојећу примјену NC у биомедицини, и даље су актуелне контроверзе о њеној биокомпатибилности. Наиме, биокомпатибилност представља способност неког биоматеријала да приликом имплантације у организам коегзистира са околним ткивом, а да при томе не изазива
---	--

¹Комисија има најмање три члана од којих најмање један није у радном односу на Универзитету

штетне ефекте код примоца, већ да својим дијеловањем доприноси планираној терапијској или дијагностичкој намјени. Стога је од пресудног значаја за разумјевање биокомпатибилности дефинисати механизме интеракције биолошког система и биоматеријала, а посебно је важно предвидјети резултат те интеракције. У основи одговора биолошког система су биохемијски, хемијски, физички и други механизми на које утичу карактеристике материјала као што су његова физичка и хемијска својства. Такође, варијабилност одговора организма у многоне зависи од његове старости, пола, степена развоја и других карактеристика. Кључна улога у одговору биолошког система на биоматеријал припада имунском систему. У том контексту највећи значај имају дендритске ћелије (енгл. *dendritic cells*, DC) с обзиром да су то прве ћелије имунског система које долазе у контакт са страним честицама и које имају кључну улогу у покретању и модулацији имунског одговора. Прије примјене наноматеријала на људима, неопходно је поред токсичности детаљно испитати и њихове ефекте на DC. Иако је NC постала веома атрактиван материјал за примјену у биомедицини, њена имуномодулациска својства, а посебно се то односи на CNC, су до сада недовољно испитана. Оно што CNC издваја у односу на друге биоматеријале, укључујући и друге типове NC су веома пожељна физичко-хемијска својства, доступност извора и јефтин процес производње. Кандидат је у овом истраживању расвјетлио поједине аспекте модулациског дјеловања CNC на фенотип и функцију DC. Наиме, показано је да CNC у нетоксичним концентрацијама усмјеравају Th одговор у правцу Th2 и T ћелија у регулаторне ћелије (енгл. *regulatory T cells*, Treg), а инхибирају Th1 и Th17 поларизацију T ћелија, што је доминантно посљедица њиховог капацитета да модулишу функције DC. Ова имуномодулациска својства CNC, захваљујући којима CNC посједују изузетан имунотерапијски потенцијал, могу бити искоришћена не само на пољу ткивног инжињеринга већ и за дизајнирање нових платформи у терапији болести у чијој основи се налази поремећај имунског система. На првом мјесту су то аутоимунске болести, али и одговор примоца на трансплантирано ткиво или орган као и све друге у којима је неопходно постићи добро контролисану индукцију толеранције посредовану са DC.

2. Оцјену да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Резултати овог рада су производ оригиналних *in vitro* истраживања на хуманим моделима мононуклеарних ћелија периферне крви (енгл. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMNC) и DC моноцитног поријекла (енгл. *monocyte derived DC*, moDC). У

циљу изолације, пропагације, испитивања вијабилности, фенотипских и функционалних карактеристика PBMNC и moDC коришћене су прихватљиве и савреме лабораторијске методе. Оригиналноста дисертације се огледа у томе што су по први пут испитана имуномодулациска својства CNC на овим ћелијским моделима. Оваква испитивања до сада нису публикована што ову дисертацију чини потпуно оригиналном.

3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Кандидат је овим истраживањем добио значајне резултате. Показао је да нетоксичне дозе CNC потенцирају антиинфламацијска својства PBMNC. Такође, CNC смањују капацитет диференцијације moDC и модификују сазријевање moDC у присуству LPS/IFN- γ . Поред тога, кандидат је показао да CNC потенцирају толерогена и антиинфламацијска, а редукују проинфламацијска својства moDC. У складу са тим CNC модификују Th поларизацијски капацитет moDC индукујући Th2 и Treg, а инхибирајући Th1 и Th17 одговор.

4. Оцјену о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему (по поглављима)²

Увод

У поглављу увод кандидат даје приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Кандидат је у уводу јасно дефинисао хемијска и физичка својства CNC и њихову примјену у биомедицини са посебним освртом на антибактеријско дејство, примјену у области ткивног инжињеринга, зарастања рана, достави лијекова и терапији тумора. Такође наводи биолошке ефекте наноцелулозе, а који се односе на хемокомпатибилност, биоразградивост, *in vitro* и *in vivo* токсичност. Посебно је нагласио значај интеракције CNC са DC у смислу имуномодулације. На крају овог поглавља јасно је истакнут научни проблем који је везан за непознанице да ли и како CNC модификују имунски одговор, што је био основни научни проблем који је у оквиру овог пројекта изучаван. Пошто до сада нису јасно описани механизми интеракције CNC и DC, чије би разумијевање могло да буде полазна основа за даља истраживања безбједне примјене CNC у хуманом систему, то је било довољно за поставку хипотеза и адекватних

²Испуњеност обима и квалитета у односу на пријављену тему, нарочито, треба да садржи: аналитички и системски прилаз у оцјењивању истраживачког постављеног предмета, циља и задатака у истраживању; испуњеност научног прилазу доказивања тврдњи или претпоставки у хипотезама, са обрадом података

циљева истраживања.

Циљеви

У поглављу циљеви истраживања, који су усаглашени са хипотезом истраживања да је имуномодулацијски ефекат CNC на Т ћелијски имунски одговор *in vitro* доминантно последица њиховог капацитета да модулишу функције DC, кандидат је јасно поставио циљеве истраживања да: испита цитотоксичност CNC на моделу хуманих PBMNC; одреди дозно зависни ефекат нецитотоксичних концентрација CNC на функционалне особине PBMNC; анализира ефекат нецитотоксичних концентрација CNC на диферентовање моноцита периферне крви у moDC и њихово сазријевање на основу фенотипских карактеристика; испитата ефекат нецитотоксичних концентрација CNC на фенотипске и функционалне особине moDC.

Материјал и методе

Кандидат је јасно указао на научни метод истраживања у свом раду. Описани су коришћени медијуми и реагенси, припрема и карактеризација CNC, изолација и култивација хуманих ћелија (изолација PBMNC из периферне крви, изолација моноцита и Т лимфоцита из PBMNC, диференцијација и сазријевање moDC) методологија која је примијењена за испитивање цитотоксичности CNC (тестови пролиферације, метаболичке активности и вијабилности PBMNC), интернализације CNC (припрема цитоспин препарата PBMNC), фенотипских (анализа на проточном цитометру) и функционалних карактеристика (анализа цитокина и алогена мијешана леукоцитна реакција). У поглављу Материјал и методе су прецизно дефинисане статистичке методе за обраду података. За истраживање је обезбијеђен пристанак донора и одобрење од надлежног Етичког комитета.

Резултати

Резултати су јасно приказани у виду графикана, правилно обрађени примјеном адекватних статистичких метода и јасно интерпретирани. У циљу испитивања имуномодулацијског потенцијала CNC најприје је одређен њихов дозно зависни цитотоксични ефекат на моделу хуманих PBMNC. Показан је значајан цитотоксични ефекат за CNC у концентрацији већој од 400 µg/ml. Утврђено је да CNC у нетоксичној (100 µg/ml) и субтоксичној (400 µg/ml) дози значајно инхибирају продукцију TNF-α, IFN-γ и IL-2, док само у већој концентрацији (400 µg/ml) инхибирају и продукцију IL-1β од стране PBMNC. Са друге стране показана је значајна стимулација продукције IL-6 и IL-17 у присуству веће дозе CNC, односно

стимулација продукције IL-10 у присуству обе дозе CNC. Анализа интеракције CNC и PBMNC је показала да лимфоцити не интернализују CNC за разлику од моноцита/макрофага и DC. У том смислу су имуномодулацијски ефекти CNC на антиген презентујућим ћелијама испитивани на моделу хуманих moDC у нецитотоксичној концентрацији 200 µg/ml. Показано је да CNC смањују капацитет диференцијације moDC с обзиром на значајно већу експресију CD14 и CD209, односно значајно мању експресију CD1а од стране moDC диферентованих у присуству CNC у поређењу са контролним moDC. CNC су модификовали сазријевање moDC у присуству LPS/IFN-γ. Наиме, moDC диферентоване у присуству CNC су показале значајно мањи капацитет повећања експресије CD83 након стимулације LPS/IFN-γ. Са друге стране, ове ћелије су HLA-DR експримирале у значајно већој мјери у односу на контролне зреле moDC. Експресија CD86 и CD40 није била значајније модификована у поређењу са контролним зрелим moDC. Такође, показан је стимулативни ефекат CNC на толерогени потенцијал moDC, с обзиром да су ове ћелије показале значајно већу експресију PD-L1, ILT-3, IDO-1, IL-33 и IL-10 у поређењу са контролним moDC. Уочено је значајно смањење концентрације IL-1β, IL-12, IL-23, а повећање концентрација IL-10 и IL-27 у супернатантима култура зрелих moDC диферентованих у присуству CNC у односу на контролне moDC. Моноцитне DC диферентоване у присуству CNC су значајно слабије стимулисале пролиферацију алогених Т лимфоцита у односу на контролне moDC. Поред наведеног, кандидат је анализирао Th поларизацијски капацитет moDC диферентованих у присуству CNC и показао да ове ћелије индукују Th2 и Treg (FoxP3⁺ Treg и Tr-1) ћелије, а инхибирају Th1 и Th17 поларизацију Т ћелија.

Дискусија

Кандидат је на веома компетентан начин коментарисао и анализирао добијене резултате, поредећи их са резултатима других студија и наводећи сва ограничења свог истраживања. Посебно су анализирани ефекти CNC на фенотипске и функционалне карактеристике moDC. Такође, посебна пажња је посвећена анализи маркера moDC диферентованих у присуству CNC и механизмима интеракције ових ћелија са CNC и алогеним Т лимфоцитима за шта су дата не само објашњења кроз аналогне студије већ су изнијете и неке сопствене хипотезе што дискусији даје додатну вриједност.

Закључци

У овом поглављу јасно и таксативно су наведени најважнији закључци докторске дисертације који представљају концизне одговоре на постављене циљеве истраживања.

Закључци јасно указују да CNC модулирају имунски одговор потенцирањем толерогених својстава DC, што за последицу има индукцију Th2 и Treg одговора, односно супресију Th1 и Th17 одговора.

Литература

У раду је цитирано 543 библиографских јединица из ове области, правилно наведених у тексту и поглављу Литература. Више од 10% референци припадају онима објављених у посљедњих 5 година.

На основу наведеног, докторска теза је по квалитету, обиму и сложености испунила циљеве и задатке постављене у пријави тезе.

5. Научне резултате докторске дисертације

Дефинисање нецитотоксичних доза CNC, њихови ефекти на пролиферацију и цитокински профил PBMNC, диференцијацију, сазријевање, толерогени потенцијал, цитокински профил и Th поларизацијски капацитет DC представљају оригиналан научни допринос кандидата.

6. Примјењивост и корисност резултата у теорији и пракси³

Према подацима Свјетске здравствене организације аутоимунске болести представљају трећи најчешћи облик хроничних обољења у свијету. У порасту је преваленца аутоимунских болести, а приближно 4% свјетске популације болује од овог типа обољења. Свјетска здравствена организација је објавила да је током 2021. године обављено 144 302 трансплантације органа. У САД је током 2022. године обављено 42 887 трансплантација органа, што је за 3,7% више у односу на претходну годину. Актуелна имуномодулацијска терапија која се користи у третману аутоимунских обољења и реакцији одбацивања трансплантата је широког спектра дејства, неспецифична за болест и сходно томе узрокује нежељене ефекте као што су инфекције и малигнитети, а већина пацијената нема оптималан терапијски одговор. Чак и новији терапијски приступи који су у повоју, као што је терапија заснована на Treg имају одређене недостатке. То су прије свега безбједност примјене Treg терапије, недовољно испитани узроци аутоимунских обољења, механизми интеракције биоматеријала и имунских ћелија као и фенотипске и функционалне

³ Истаћи посебно примјењивост и корисност у односу на постојећа рејешења теорије и праксе

карактеристике различитих субпопулација DC и Treg. Развој нових терапијских метода уз употребу CNC би могао бити један од путева за откривање ефикаснијих стратегија за терапију аутоимунских обољења и реакције одбацивања трансплантата. Коначни циљ свих ових истраживања би била помоћ у лијечењу пацијената обољелих од аутоимунских болести, али и унапређење одговора примаоца на трансплантирано ткиво или орган као и помоћ у лијечењу свих пацијената код којих је неопходно постићи добро контролисану и DC-посредовану индукцију толеранције. Међутим, до тог циља пут је дуг, а ово истраживање је трасирало неке од њих на истраживачком нивоу.

7. Начин презентирања резултата научној јавности⁴

Др Милош Васиљевић је дио резултата свога истраживања приказао на 5. Европском конгресу имунолога, одржаном у Амстердаму, Холандији у септембру 2018. године, и објавио рад *in extenso* у часопису *International Journal of Nanomedicine* у јулу 2022. године (IF: 7.033; индексиран у базама података: UGC CARE, Scopus, SCIE, DOAJ, PubMed; SJR: 1.245).

8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ⁵

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом "Имуномодулацијска својства природних целулозних нанокристала", Комисија је једногласно закључила да је кандидат изабрао актуелну и оригиналну тему истраживања коју је спровео поштујући све принципе научног рада и користећи савремене методе испитивања и анализе резултата. Добијени резултати, оригинални по свом садржају и интерпретацији, представљају значајан допринос савременој медицинској науци, посебно у области имунологије. На основу наведеног, Комисија са задовољством предлаже Научно-наставном вијећу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву да прихвати извјештај о урађеној докторској дисертацији и одобри јавну одбрану докторске дисертације др Милошу Васиљевићу, у поступку стицања звања доктора медицинских наука.

Мјесто: Фоча
Датум: .05.2023

⁴ Наводе се радови докторанта у зборницима и часописима у којима су објављени (истраживачки проблеми и резултати предмета истраживања докторске дисертације)

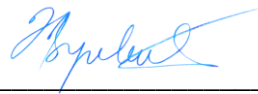
⁵У закључку се, поред осталог, наводи и назив квалификације коју докторант стиче одбраном тезе

Комисија:

1. Академик Проф. др Миодраг Чолић, редовни професор, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет у Фочи, предсједник Комисије.



2. Проф. др Драгана Вучевић, редовни професор, научни савјетник, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, члан Комисије.



3. Проф. др Сениша Ристић, редовни професор, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.

4. Проф. др Дејан Бокоњић, редовни професор, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.



5. Доц. др Иван Радић, доцент, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.

Издвојено мишљење⁶:

1. _____, у звању _____ (НО _____, УНО

_____, Универзитет _____,

Факултет _____ у _____, члан Комисије;

⁶Чланови комисије који се не слажу са мишљењем већине чланова комисије, обавезни су да у извештај унесу издовојено мишљење са образложењем разлога због се не слажу са мишљењем већине чланова комисије (члан комисије који је издвојио мишљење потписује се испод навода о издвојеном мишљењу)