

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-132, именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата др Марије Дракул под насловом "**Антиинфламацијска и имуномодулацијска својства ситаглиптина, инхибитора дипептидил пептидазе-4, у моделима интеракције хуманих антиген-презентујућих ћелија и Т лимфоцита *in vitro***" (у даљем тексту: Комисија)¹ у сљедећем саставу:

1. Проф. др Иван Јовановић, редовни професор, ужа научна област Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, предсједник комисије.
2. др. sci. Сергеј Томић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за примену нуклеарне енергије, ужа научна област Имунобиологија, члан комисије
3. Проф. др Душан Михајловић, ванредни професор, ужа научна област Дерматологија и венеричне болести, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, члан комисије
4. Доц. др Маријана Ковачевић, доцент, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, члан комисије.
5. Доц. др Радмила Балабан Ђуревић, доцент, ужа научна област Анатомија са морфологијом, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, 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 антиинфламацијска и имуномодулацијска својства ситаглиптина, инхибитора дипептидил пептидазе-4, обрађује актуелну проблематику која је са научног аспекта веома значајна. Дипептидил пептидаза 4 (DPP-4)/CD26—је трансмембрански гликопротеин типа II, молекулске масе 110 kD. Хумани DPP-4/CD26 се састоји од интрацелуларног домена (чини га 6 кратких аминокиселина), трансмембранског региона и екстрацелуларног домена који поседује дипептидил-пептидазну и имуномодулаторну активност. DPP-4/CD26 је широко експримиран у различитим органима (бубрези, možдано ткиво, плућа, јетра, гастроинтестинални тракт, миокард), као и на површини различитих типова ћелија као

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

што су ендотелне, епителне, стромалне, матичне ћелије, као и ћелије имунског система (лимфоцити, моноцити, NK ћелије). Данас је у употреби група оралних антидијабетичних лекова, који представљају селективне DPP-4 инхибиторе (DPP-4i), често једним именом названи глиптини. Ситаглиптин је први селективни DPP4i који је одобрен за лечење дијабетес мелитуса (ДМ) тип 2, од стране Америчке агенције за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration, FDA*) 2006. године. Услед широке експресије DPP-4/CD26 молекула, последњих година велики број истраживања указује на друге ефекте DPP-4i, који су независни од њиховог хипогликемијског деловања, као што су антиинфламацијски и имуномодулацијски ефекти. Међутим, много је непознаница о молекулским механизмима који се налазе у основи ових процеса, што је и основни научни проблем изучавања у оквиру овог пројекта. Дендритске ћелије (DCs) су најпотентније антиген-презентујуће ћелије, специјализоване за покретање имунског одговора, усмеравањем активације и диференцијације Т-лимфоцита али и регулације имунског одговора. Експресија DPP4/CD26 је прво описана на DCs из лимфних чворова говеда, а затим на DCs из висцералног масног ткива, код гојазних људи и глодара. Касније је показано да CD26-ADA комплекс на DCs стимулише пролиферацију Т-ћелија, путем деградације аденозина. Међутим, још увек не постоје подаци о утицају DPP-4i на фенотип и потенцијалне имуномодулацијске функције DCs. Кандидаткиња је као основни модел користила DCs добијене из моноцита периферне крви (MoDCs). Ситаглиптин је додаван на почетку диференцијације MoDCs или након њихове диференцијације. MoDCs су ко-култивисане са пурификованим Т лимфоцитима. Кључни резултат који је добијен у овим истраживањима је да ситаглиптин испољава снажан имуномодулацијски одговор на Т лимфоците, пре свега тако што индукује диференцијацију MoDCs. Последица тога је смањење капацитета MoDC да индукују Th1 и Th17 одговор, а повећају Th2 одговор и индукују регулаторне Т ћелије (Treg). Наведени механизми су праћени смањеном продукцијом проинфламацијских цитокина од стране MoDC. Због тога се може рећи да је оригиналност овог рада управо садржана у наслову ове тезе да ситаглиптин у приказаном *in vitro* моделу испољава анти-инфламацијска и имуномодулацијска својства што отвара перспективе његове примене у терапији аутоимунских и хроничних запаљенских болести.

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

Кандидаткиња је користила добро познат модел кокултуре MoDCs и Т ћелија којим се на најефикаснији начин проверавају различите функције имунског одговора *in vitro*. Коришћењем савремене и комплексне методологије која се користи у ћелијској биологији и имунологији добијени су по први пут веома значајни и оригинални резултати који нису

до сада публиковани у научној литератури. Оригиналноста да ситаглиптин индукује толерогене DCs са потенцијалом супресије проинфламацијских имунских одговора индукцијом Treg је додатно потврђена обимном анализом литературних података кроз поглавље Дискусија. Оригиналноста овог рада је и први пут показана експресија DPP-4/CD26 која се повећава са процесом матурације MoDCs. Такође су испитани и поједини сигнални механизми.

3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Као што је већ истакнуто, кандидаткиња је током спроведеног истраживања добила значајне и оригиналне резултате. Показано је да ситаглиптин у нетоксичним концентрацијама смањује капацитет диференцијације MoDC и модификује сазревање MoDC индуковано LPS-ом и IFN- γ . Такође, ситаглиптин је стимулисао експресију DPP-4/CD26 на MoDCs, који може бити и маркер матурације ових ћелија. Ситаглиптин је редуковао проинфламацијски и алостимулацијски потенцијал MoDC, а потенцирао антиинфламацијска својства. Поред тога, показано је да MoDC диферентоване у присуству ситаглиптина инхибирају Th поларизацију у правцу Th1 и Th17 одговора, а стимулишу усмеравање Th одговора у правцу Th2 и Treg ћелија. Додатно, MoDCs диферентоване у присуству ситаглиптина повећавају експресију толерогених маркера (ILT3, ILT4), што корелира са већом способношћу индукције TGF- β + Treg и Tr1 ћелија. У циљу испитивања механизма који се налазе у основи описаних ефеката ситаглиптина утврђено је да је ситаглиптин инхибира експресију сигналних молекула p65 NF- κ B и p38 MAPK у MoDC.

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

Увод

У поглављу увод кандидаткиња даје приказ до сада познатих чињеница из литературе које су непосредно везане за тему докторске дисертације. У уводу је јасно дефинисана структура и функција DPP-4/CD26, као и експресија овог протеина у различитим органима и ткивима, са посебним освртом на ћелије имунског система. Такође, детаљно је описана улога DPP-4/CD26 као и последице DPP-4/CD26 инхибиције у урођеној и стеченој имуности. Кандидаткиња је јасно описала развој и клиничку примену DPP-4i. Додатно, описани су терапијски ефекти DPP-4i, који се јављају независно од контроле

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

гликемије, укључујући примену у аутоимунским болестима, инфективним болестима и болестима повезаним са инфламацијом, као и антитуморско деловање ове групе лекова.

На крају овог поглавља јасно је истакнут научни проблем који је везан за непознанице да ли и на који начин ситаглиптин испољава антиинфламацијско и имуномодулацијско деловање, као и који молекуларни механизми се налазе у оквиру ових процеса, што је био и основни научни проблем изучаван у оквиру овог пројекта. До сада није истражен и описан ефекат DPP-4i на диференцијацију, сазревање и функције хуманих дендритских ћелија, које представљају најпотентније антиген-презентујуће ћелије, што је био и главни предмет истраживања у овом пројекту.

Циљеви

У поглављу Циљеви истраживања, кандидаткиња је на основу постављених хипотеза јасно дефинисала циљеве истраживања. На основу хипотезе да ситаглиптин испољава дозно зависни цитотоксични ефекат на хумане MoDCs и PBMCs, кандидаткиња је јасно поставила циљ истраживања: Испитати дозно зависни цитотоксични ефекат ситаглиптина на *in vitro* моделу хуманих MoDCs и PBMCs, одређивањем процента апоптотичних и некротичних ћелија, као и метаболичке активности ћелија. На основу хипотезе да је имуномодулацијски ефекат ситаглиптина на Т ћелијски имунски одговор *in vitro* доминантно последица индукције толерогених MoDCs са потенцијалом смањења Th1 и T17 одговора, повећања Th2 одговора и индукције регулаторних Т ћелија, посредством NF-κappa-B и MAP киназног сигналног пута, кандидаткиња је поставила следеће циљеве истраживања: Испитати фенотипске и функционалне карактеристике MoDC диферентованих у присуству ситаглиптина; испитати утицај ситаглиптином третираних MoDC на пролиферацију и поларизацију алогених Т лимфоцита; испитати ефекат нецитотоксичних концентрација ситаглиптина на продукцију цитокина; испитати експресију сигналних молекула p65 NF-κappa-B и p38 MAP киназа у MoDC третираних ситаглиптином.

Материјал и методе

Кандидаткиња је, базирајући се на прихваћеном научном методу у имунолошким истраживањима, користила савремену методологију. Сагласност за извођење студије прибављена је од Етичког Комитета Медицинског факултета у Фочи, као и потписаним информисаним пристанком здравих добровољних давалаца. Јасно су наведени сви најзначајнији методолошки поступци и материјали: медијуми и реагенси, изолација и култивација хуманих ћелија (изолација PBMC из периферне крви, издвајање моноцита и Т лимфоцита методама адхеренце и магнетног сортирања), методологија која је примењена за испитивање цитотоксичности ситаглиптина (МТТ тест, тестови

апоптозе/некрозе), анализа фенотипских (анализа на проточном цитометру) и функционалних карактеристика МоDC (анализа цитокина и алогена мешана леукоцитна реакција), као и метода кориштена за испитивање активације сигналних молекула p65 NF-каппа-B и p38 MAP у МоDC третираним ситаглиптином (Western blot). Прецизно су дефинисане статистичке методе кориштене за обраду података.

Резултати

Резултати су правилно обрађени применом адекватних статистичких метода, представљени у виду графикона и јасно интерпретирани. У циљу испитивања антиинфламацијског и имуномодулацијског потенцијала најпре је одређен дозно зависни цитотоксични ефекат ситаглиптина на моделу хуманих РВМС и МоDC. Цитотоксичан ефекат је утврђен само код највеће примењене концентрације ситаглиптина (1000µg/mL). Ћелијске културе су доминантно третиране ситаглиптином (500µg/mL) на почетку диференцијације (ситаглиптин 0д протокол) или након диференцијације МоDC (ситаглиптин 4д протокол). Ситаглиптин је инхибирао диференцијацију и сазревање МоDC, што је процењено на основу снижене експресије маркера CD40, CD83, CD86, NLRP3, HLA-DR, непромењене експресије CD14 и инхибиције продукције IL-1β, IL-12p70, IL-27, IL-23, након примене ситаглиптина. Насупрот томе ситаглиптин је довео до повећања експресије CD26, толерогених маркера (ILT4, IDO) и повећање продукције имунорегулаторних цитокина (IL-10 и TGF-β). Сви резултати су били израженији када је ситаглиптин додат на почетку диференцијације (ситаглиптин 0д протокол). МоDC третиране ситаглиптином су показале слабији капацитет алостимулације Т ћелија у МоDC/Т ћелијским ко-културама. Примена ситаглиптина је довела до инхибиције Th1 и Th17 одговора, а стимулације Th2 и Treg ћелија. Толерогена својства МоDC третираних ситаглиптином додатно су потврђена, повећањем удела CD4+CD25+CD127- FoxP3+ Treg и Tr1 ћелија (CD4+IL-10+ FoxP3-) у МоDC/Т ћелијским ко-културама. Диференцијација IL-10+ и TGF-β+ Treg, зависила је од кориштеног протокола ситаглиптина. Western blot анализа је показала да ситаглиптин инхибира експресију p65 NF-κB и p38 MAPK, током сазревања МоDC.

Дискусија

Кандидаткиња је на компетентан начин анализирала и коментарисала добијене резултате, поредећи их са резултатима других студија и наводећи сва ограничења свог истраживања. У овом поглављу су од укупно 668 референци кориштене 253 референце. Посебно су дискутовани потенцијални механизми којима ситаглиптин испољава модулатијске ефекте на параметре фенотипских и функцијских својстава МоDC који могу бити

последица инхибиција протеазне активности DPP-4/CD26 али и блокирања интеракције овог молекула са његовим бројним лигандима. Такође је, у циљу утврђивања механизма који се налазе у основи деловања ситаглиптина, анализирана потенцијална улога сигналних путева p65 NF-κB и p38 MAPK, што се уклапа у претпостављени концепт деловања овог инхибитора који је добијен у другим моделима. Дискусија је веома обимна и детаљна, веома добро документована подацима из литературе и веома компетентно написана.

Закључци

У овом поглављу су јасно наведени најважнији закључци докторске дисертације који престављају конкретне и потпуне одговоре на постављене циљеве истраживања. Закључци јасно указују да је модулаторни ефекат ситаглиптина на Т ћелијски имунски одговор *in vitro* доминантно последица индукције толерогених MoDCs са потенцијалом смањења Th1 и Th17 одговора, повећања Th2 одговора и индукције регулаторних Т ћелија.

Литература

У раду је цитирано укупно 668 библиографских јединица из ове области, правилно наведених у тексту и поглављу Литература. Више од 10% референци припадају онима објављених у последњих 5 година.

Докторска дисертација је по квалитету, обиму и сложености испунила циљеве и задатке постављене у пријави дисертације.

5. Научне резултате докторске дисертације

Оригинални научни допринос кандидаткиње у овом истраживању представља: доказ о нецитотоксичност ситаглиптина до 1000 μg/mL; доказивање инхибиторних ефектата ситаглиптина на диференцијацију, сазревање и толерогени потенцијал MoDCs; приказ карактеристичног фенотипског и цитокинског профила MoDCs под утицајем ситаглиптина; утицај ситаглиптина на инхибицију алостимулацијских својства MoDCs и модулацију њиховог Th поларизацијског капацитета; доказ да ситаглиптин инхибира експресију p65 NF-κB и p38 MAP киназа у MoDCs.

6. Примјењивост и корисност резултата у теорији и пракси³

У току последњих 30 година, многа експериментална и клиничка истраживања указују да DPP-4/CD26, услед широке експресије у различитим ткивима и органима, игра важну

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

улогу у многим патолошким процесима и болестима имунског система пре свега у аутоимунским болестима, инфективним и другим инфламаторним и дегенеративним болестима повезаним са инфламацијом, као и у малигним туморима. Иако су након примене DPP-4i у клиничкој пракси забележени позитивни исходи, описани су и нежељени ефекти (прогресија неких тумора или погоршања појединих аутоимунских болести). Због тога се ефекти ситаглиптина и других DPP-4i морају пажљиво пратити кроз циљане студије. Истраживање спроведено у оквиру ове тезе може допринети расветљавању механизма укључених у антиинфламацијско и имуномодулативно деловање DPP-4 инхибитора, као и молекуларних механизма који се налазе у основи ових процеса, што би могло довести до отварања перспективе примене ове групе лекова у другим болестима. Постоји јако мало података о механизмима имуномодулативних ефеката ситаглиптина и других DPP-4i, а нарочито када се ради о индукцији толерогених DCs и њиховој комплексној улози у модулативној имунској одговору. Да би ови лекови, поред улоге у регулацији метаболизма глукозе, нашли потенцијалну примену у лечењу других болести које су повезане са поремећајима имунског система потребно је разјаснити имунске аспекте њиховог деловања, што је био основни циљ ове студије.

7. Начин презентирања резултата научној јавности⁴

Др Марија Дракул је део резултата из овог истраживања презентовала на Конгресу имунолога одржаном у Београду (Р. Србија) у децембру 2019. године и Европском конгресу младих имунолога, одржаном у Берлину (Немачка) у новембру 2022. године. Кандидаткиња је објавила оригинални рад *in extenso* под називом “*Sitagliptin induces tolerogenic human dendritic cells*” у часопису *International Journal of Molecular Sciences* (IF: 6.2) у новембру 2023, као и прегледни рад из исте теме под називом “*Immunomodulatory activity of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in immune-related diseases*”, у часопису *European Journal of Immunology* (IF: 5.4) у септембру 2023.

8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ⁵

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом "Антиинфламацијска и имуномодулативна својства ситаглиптина, инхибитора дипептидил-пептидазе-4, у моделима интеракције хуманих антиген-презентујућих ћелија и Т лимфоцита *in vitro*", Комисија је једногласно закључила да је кандидаткиња изабрала актуелну и оригиналну тему истраживања коју је спровела поштујући све принципе научног рада и користећи савремене методе испитивања и анализе резултата. Добијени резултати, оригинални по

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

свом садржају и интерпретацији, представљају значајан допринос савременој медицинској науци, посебно у области имунологије. На основу наведеног, Комисија са задовољством предлаже Научно-наставном већу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву да прихвати извештај о урађеној докторској дисертацији и одобри јавну одбрану докторске дисертације др Марији Дракул, којом ће стећи звање доктора медицинских наука.

Мјесто: Фоча

Датум: _____

Комисија:

1. Проф.др Иван Јовановић, редовни професор, ужа научна област
Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу, предсједник комисије

2. др. sci. Сергеј Томић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду,
Институт за примену нуклеарне енергије, ужа научна област Имунобиологија,
члан комисије

3. Проф.др Душан Михајловић, ванредни професор, ужа научна област
Дерматологија и венеричне болести, Војномедицинска академија, Београд,
члан комисије

4. Доц. др Маријана Ковачевић, доцент, ужа научна област Интерна медицина,
Медицински факултет у Фочи, члан комисије.

5. Доц. др Радмила Балабан-Ђуревић, доцент, ужа научна област Анатомија са
морфологијом, 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)