

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3/192 од 12.03.2025, именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата Зечевић др Снежана под насловом "ЦИТОКОМПАТИБИЛНОСТ И ИМУНОМОДУЛАЦИЈСКА СВОЈСТВА ВОЛФРАМ ДИСУЛФИДНИХ НАНОЧЕСТИЦА У КУЛТУРИ ХУМАНИХ ЛЕУКОЦИТА" (у даљем тексту: Комисија¹) у сљедећем саставу:

1. Проф. др Душан Михајловић, предсједник комисије _____
2. Проф. др Иван Николић, Медицински факултет Ниш, члан комисије _____
3. Доц. др Марија Дракул, члан комисије _____

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

ИЗВЈЕШТАЈ **о оцјени урађене докторске дисертације**

1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области
Урађена докторска дисертација, у којој је испитивана цитокомпатибилност и имуномодулацијска својства волфрам дисулфидних наночестица у култури хуманих леукоцита обрађује актуелну проблематику која је са научног аспекта актуелна и значајна. Основни предмет истраживања у овом раду су волфрам-дисулфидне наночестице (WS_2). Ове наноструктуре представљају специфичан и јединствен систем са великим могућностима примјене у различитим областима, укључујући биомедицину. Структура им је у облику полиедра састављена из више дводимензионалних цилиндричних слојева који су међусобно чврсто везани ван дер Валсовим силама, са шупљином у средишту, слична фулеренима. Код њих је хексагонални слој атома волфрама смјештен у сендвичу између 2 хексагонална слоја сумпора. Оваква структура значајно доприноси одређеним електричним и магнетним особинама, као и могућностима за интеракције са различитим супстратима. Постоје различите наноструктуре које су синтетисане на бази WS_2 попут наноцијеви, квантних тачака, наноплоча, наночестица, нанолистова и хибридних структура. Највише се истражују и примењују наночестице у облику неорганских фулерену сличних структура ($IF-WS_2$) али и других дводимензионалних (2D) структура као што су наноцијеви, нанолистови, квантне

тачке, различити композити или хибриди. Друго својство које истиче ове наноструктуре је лакоћа функционализације. Функционализација подразумева модификацију површине ради побољшања колоидне стабилности и дисперзibilности. Са друге стране, за честице се могу везати лијекови или други биомолекули. Поље примјене WS₂ и других метал-сулфидних наночестица је веома широко. Оно укључује различите тераностичке процедуре као што су магнетна резонанца, компјутеризована томографија, оптичко и фотоакустично снимање, фототермална и фотодинамичка терапија, и њихове комбинације. Достава лијекова, биомолекула или ДНК до специфичних циљних ткива, посебно тумора, од стране 2D WS₂ и њихова употреба као електрохемијских и оптичких биосензора у дијагностици су доминантне биомедицинске области њихове примјене. Такве примјене су могуће и могу се додатно подешавати захваљујући специфичним електронским својствима, луминесценцији, Раман расејању и другим карактеристикама WS₂ наноструктуре. Одсуство токсичности је општи предуслов за биомедицинску примјену наночестица, и у том контексту, 2D WS₂ се сматрају биокомпатибилним на основу одсуства цитотоксичности и генотоксичности показаним у различитим експериментима. Посебно је истакнута важност проучавања интеракција наночестица са имунским системом посебно када се разматра њихова *in vivo* примјена. Обзиром да се скоро ништа не зна о утицају WS₂ наночестица на имунске реакције постоји оправданост да се ти процеси изуче, најпре на адекватним *in vitro* моделима у којима би се истовремено проучавале морфолошке промјене (цитотоксичност, некроза, апоптоза) и функција (фагоцитоза, пролиферација, продукција цитокина, оксидативни стрес). Један од погодних модела у овом контексту су културе појединих популација леукоцита периферне крви (мононуклеарне ћелије, гранулоцити) након адекватне стимулације. Из многих досадашњих студија је познато да се функције имунских ћелија могу изучавати примјеном нецитотоксичних концентрација наночестица, (које увијек треба на датим ћелијским моделима одредити) и на наночестицама чија је физичко-хемијска структура јасно дефинисана. Оба ова параметра су директно примјењива и у овој студији. Непознанице да ли су и у којим концентрацијама IF-WS₂ цитотоксичне за популације леукоцита, да ли и како модулишу инфламацијске и имунске реакције посматрано кроз призму анализе различитих цитокина, да ли и на који начин фагоцитне и нефагоцитне ћелије крви интернализују ове наночестице и какав би био одговор ћелија након њихове ингестије. Кандидаткиња је као основни модел користила културе мононуклеарних ћелија и гранулоцита периферне крви. IF-WS₂ су растваране у комплетном медијуму RPMI- 1640 у различитом опсегу концентрација од 6,25 µg/ml - 400 µg/ml, потом додаване у културе мононуклеарних ћелија и гранулоцита периферне крви. Крајњи резултат који је добијен је да су природне, нефункционализоване IF-WS₂ наночестице цитокомпатибилне и да испољавају значајна антипролиферативна, антиинфламаторна и имуномодулаторна својства у култури мононуклеарних ћелија

периферне крви (PBMNC) и гранулоцита. Антинфламаторни одговор активираних имунских ћелија на WS₂, заједно са смањењем Th1, Th17 и Th21 одговора као и инхибиција производње ROS-а и смањење продукције NET-ова у култури хуманих гранулоцита чине најзначајније резултате. Због тога се може рећи да је оригиналност овог рада управо садржана у наслову ове тезе да IF-WS₂ у приказаном *in vitro* моделу испољава цитокомпатибилна и имуномодулацијска својства што отвара чини овај дишало-генид привлачним биоматеријалом за потенцијалну примјену у лијечењу аутоимунских болести и у спрјечавању реакција на трансплантирана ткива и органе.

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

Кандидаткиња је користила добро познат модел кокултуре PBMNC и хуманих гранулоцита којим се провјеравају 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. Оригиналност да IF-WS₂ наночестице показују цитокомпатибилна и имуномодулацијска својства у култури хуманих мононуклеара и гранулоцита са заједно са смањењем Th1, Th17 и Th21 одговора као и инхибиција производње ROS-а и смањење продукције NET-ова у култури хуманих гранулоцита је додатно потврђена обимном анализом литературних података кроз поглавље Дискусија.

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 IF-WS₂ наночестице у опсегу двоструко растућих концентрација (12,5–100 µg/ml) не показују цитотоксичност према укупним PBMNC, моноцитима и гранулоцитима. Такође је показано да највиша кориштена концентрација (200 µg/ml) изазива благ пораст апоптотских ћелија укупних PBMNC, првенствено због цитотоксичног ефекта на моноците. Ове наночестице дозно-зависно инхибирају пролиферацију PBMNC стимулираних са РНА у култури, уз истовремену инхибицију продукције IL-2 цитокина. IF-WS₂ наночестице стимулишу продукцију имунорегулаторног цитокина IL-10, док истовремено инхибирају продукцију проинфламаторних цитокина IL-1β, IL-8, GRO-α, TNF-α, као и Th1 (IFN-γ), Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-22), Th9 (IL-9), Th21 (IL-21) и Th2 цитокина (IL-4, IL-5, IL-13) након тродневне инкубације са стимулираним PBMNC. Након дводневне инкубације у присуству нижих концентрација, детектован је стимулацијски ефекат на продукцију IL-4 и IL-5. Поред тога показано је да моноцити и гранулоцити фагоцитишу IF-WS₂ наночестице у култури на дозно и временски зависан начин, док лимфоцити не показују тај ефекат. Када су у питању гранулоцити

запажен је инхибитарни ефекат наночестица на продукцију ROS и формирање неутрофилних екстрацелуларних замки у култури хуманих гранулоцита.

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 су приказана позната сазнања о физичко-хемијским својствима наночестица са посебним освртом на њихов ефекат на имунски систем. Такође детаљно је описан историјски развој и структура WS₂ наночестица као и њихове досадашње многобројне примјене и начин производње. Кандидаткиња је јасно описала њихова хемијска и физичка својства и предности у односу на MoS₂ као најсличније структуре. Додатно, описана је њихова примјена у разним сферама са посебним освртом на њихову биомедицинску примјену. На крају овог поглавља јасно је истакнут научни проблем који је везан за непознанице ;да ли су и у којим концентрацијама IF-WS₂ цитотоксичне за популације леукоцита; да ли и како модулишу инфламацијске и имунске реакције посматрано кроз призму анализе различитих цитокина; да ли и на који начин фагоцитне и нефагоцитне ћелије крви интернализују ове наночестице; и какав би био одговор ћелија након њихове ингестије. До сада није истражен ефекат IF-WS₂ на пролиферацију PBMNC, фагоцитозу од стране PBMNC и гранулоцита као и њихов ефекат на продукцију проинфламаторних цитокина и хемокина и ефекат на функцију гранулоцита.

Циљеви

У поглављу Циљеви истраживања, кандидаткиња је на основу постављених хипотеза јасно дефинисала циљеве истраживања. Хипотезе гласе: Високе концентрације IF-WS₂ наночестица су цитотоксичне за моноците и гранулоците периферне крви, као последица про-апоптотског и про-оксидативног ефекта фагоцитованих честица, док су нецитотоксичне за лимфоците који не фагоцитују ове наночестице. Нецитотоксичне концентрације IF-WS₂ наночестица испољавају дозно-зависни инхибиторни ефекат на пролиферацију Т лимфоцита у култури моноклеарних ћелија периферне крви стимулираних фитохемаглутинином, смањују продукције проинфламацијских цитокина и хемокина и различито модулирају продукцију цитокина од стране субпопулација Th ћелија. За проверу хипотеза кандидаткиња је поставила следеће циљеве истраживања: Испитати физичко-хемијске карактеристике IF-WS₂ наночестица; испитати дозно зависну цитотоксичност IF-WS₂ наночестица у култури укупних хуманих моноклеарних ћелија периферне крви (PBMNC), гранулоцита и лимфоцита; испитати дозно зависни степен фагоцитозе IF-WS₂ наночестица од стране PBMNC и гранулоцита периферне крви; испитати дозно зависни ефекат IF-WS₂ наночестица на пролиферацију PBMNC стимулираних фитохемаглутинином (PHA) у култури; испитати дозно зависни ефекат IF-WS₂ наночестица на продукцију проинфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-6) и хемокина (IL-8, MCP-1, GRO- α), Th1, Th2, Th17 и Т регулаторних цитокина у културама PBMNC стимулираних са PHA; Испитати дозно зависни ефекат IF-WS₂

наночестица на функцију гранулоцита (оксидативни прасак и формирање неутрофилних екстраћелијских замки).

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. Потписани информисани пристанак је добијен од здравих добровољних давалаца. Јасно су наведени сви најзначајнији методолошки поступци и материјали: анализа наночестица, медијуми и реагенси, изолација и култивација хуманих ћелија (изолација PBMNC и гранулоцита из периферне крви методологија која је примењена за испитивање цитотоксичности IF-WS₂ (вијабилност помоћу Трипан-плавог, тестови апоптозе и некрозе), тестови пролиферације, анализа интернализације IF-WS₂ (гранулоцити и моноцити) и функционалних карактеристика PBMNC (продукција цитокина), као и гранулоцита (продукција NET-ова и реактивних кисеоничних врста).

Резултати

Резултати су правилно обрађени примјеном адекватних статистичких метода, представљених у виду графикана и табела те јасно интерпретирани. У циљу испитивања физичко хемијских карактеристика WS₂ извршена је њихова NTA карактеризација. Следећи корак се односио на испитивање дозно зависног цитотоксичног ефекта моделу хуманих PBMNC и издвојене популације моноцита, лимфоцита и гранулоцита. Резултати су показали да су концентрације до 100 µg/ml нецитотоксичне за укупне PBMNC и моноците док су двоструко веће концентрације (200 µg/ml) нецитотоксичне за лимфоците. Због специфичног дизајна ефекат IF-WS₂ је испитиван доминантно у популацији PBMNC. У циљу изучавања механизма цитотоксичног ефекта већих концентрација IF-WS₂ на PBMNC. Резултати су потврдили резултате студија вијабилности и показали одсуство цитотоксичности до 100 µg/ml IF-WS₂. Највећа концентрација (200 µg/ml) је довела до статистички значајног повећања процента апоптотских ћелија. Потом је вршено испитивање морфолошких карактеристика PBMNC у култури са IF-WS₂ са посебним освртом на интернализацију наночестица. Анализа цитоспин препарата је вршена свјетлосном микроскопијом и проточном цитометријом. Резултати су показали да је степен интернализације наночестица од стране моноцита био дозно зависан до концентрације од 100 µg/ml, Интересантно је да је при највећој концентрацији IF-WS₂ наночестица (200 µg/ml) степен њихове интернализације био нешто мањи него при концентрацији од 100 µg/ml. На основу PhI израчунатог после 24 часа култивације запажа се повећање вриједности фагоцитног индекса с тим да је много бољи тренд повећања степена фагоцитозе је примјећен након 48 часова са статистички значајним разликама између свих концентрација у поређењу са најнижом. фагоцитни индекси у односу на исту концентрацију наночестица а различито време култивације запажа се да су осим за најмању концентрацију све разлике биле статистички значајно веће у односу на дужи временски период култивације. Анализа

на проточном цитометру је показала да моноцити/макрофаги фагоцитују IF-WS₂ наночестице на дозно зависан начин док су лимфоцитни нефагоцитни. WS₂ је показао инхибирање пролиферације PBMNC уз инхибицију проинфламаторних цитокина и хемокина уз повећање продукције антиинфламаторног цитокина IL-10. Додатно, испитивана је функција гранулоцита гдје је показан инхибиторни ефекат на продукцију ROS-а и NeT-ова.

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 198 референци кориштене 85 референци. Посебно су дискутоване физичко хемијске карактеристике IF-WS₂, уз дискутовање и анализу биокомпатибилности и свих кориштених појединачних цитокина, као и детаљна анализа утицаја IF-WS₂ на функцију гранулоцита. Дискусија је веома детаљна, веома добро документована подацима из литературе и веома компетентно написана.

Закључци

У овом поглављу су јасно представљени најзначајнији закључци докторске дисертације, који пружају прецизне и свеобухватне одговоре на постављене циљеве истраживања. Резултати указују да је имуномодулацијски ефекат IF-WS₂ in vitro превасходно последица инхибиције пролиферације PBMNC, уз истовремену супресију продукције IL-2, као и инхибицију Th1, Th2, Th17, Th9 и Th21 цитокина, док истовремено стимулише продукцију имунорегулаторног цитокина IL-10. Поред тога, потврђен је и инхибиторни ефекат на функцију гранулоцита..

. Литература

У раду је цитирано укупно 198 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.

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. Према процјенама Свјетске здравствене организације, годишње се у свијету овави око 150000 трансплатација органа. У САД-у је током 2023. Године обављено 42 800 трансплантација органа, што је за 4,4% више у односу на претходну годину. Савремене имуносупресивне терапије, које се примењују у лечењу аутоимунских болести и спречавању одбацивања трансплантата, углавном делују неселективно, потискујући широк спектар имунолошких механизма. Овај недостатак често доводи до

нежељених ефеката, попут повећане склоности ка инфекцијама и већег ризика од малигнитета. Развој нових терапијских метода уз употребу WS₂ би могао бити један од путева за откривање ефикаснијих стратегија за терапију аутоимунских обољења и реакције одбацивања трансплантата. Ако се функционализују са одговарајућим имуностимулаторима заједно са њиховим изузетним фототермалним ефектима WS₂ би могао бити привлачан за имунотерапију тумора. 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. Међутим до тог циља постоје бројна ограничења а ови пионирски резултати би могли престављати добар почетак за нове експерименте.

7. Презентирање резултата научној јавности⁴

Др Снежана Зечевић је дио резултата свога истраживања приказала на седмом Европском конгресу имунолога одржаном у Даблину. Ирска у септембру 2024 године и објавила рад у часопису *Nanomaterials* у фебруару 2025 (IF-4,4 индексиран у базама података: SCOPUS; SCIE; PubMed; PMC; CAPlus/ SciFinder; Inspec.

8. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ⁵

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом „ЦИТОКОМПАТИБИЛНОСТ И ИМУНОМОДУЛАЦИЈСКА СВОЈСТВА ВОЛФРАМ ДИСУЛФИДНИХ НАНОЧЕСТИЦА У КУЛТУРИ ХУМАНИХ ЛЕУКОЦИТА“ 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 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 Снежани Зечевић, у поступку стицања звања доктора медицинских наука.

¹ Комисија мора бити именована у складу са чланом 40. Правилника о студирању на трећем циклусу студија на Универзитету у Источном Сарајеву

² Испуњеност 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 прилаз у доказивања тврдњи или претпоставки у хипотезама, са обрадом података.

³ Истаћи посебно примјенивост и корисност у односу на постојећа рјешења теорије и праксе.

⁴ У складу са чланом 37. Правилника о студирању на трећем циклусу студија на Универзитету у Источном Сарајеву.

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

Мјесто: Фоча
Датум: 28.03.2025

Комисија:

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

2. Проф.др Иван Николић, редовни професор , ужа научна област Хистологија и ембриологија, Медицински факултет Ниш, Универзитета у Нишу, члан Комисије.

3. Доц. др Марија Дракул , доцент ужа научна област Анатомија и морфологија , Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.

⁶ Чланови комисије који се не слажу са мишљењем већине чланова комисије, обавезни су да у извештај унесу издвојено 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)

_____, Универзитет _____,
Факултет _____ у _____, члан Комисије;

Образложење:
