

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-46 од 20.11.2019.године, именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата Јоксимовић др Бојана под насловом "Фенотипске и функционалне карактеристике хуманих мијелоидних супресорских ћелија диферентованих *in vitro* од моноцита под утицајем фактора стимулације гранулоцитних/макрофагних колонија, интерлеукина 6 и простагландина Е2"

(у даљем тексту: Комисија)<sup>1</sup> у сљедећем саставу:

1. Академик Проф. др Миодраг Чолић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет у Фочи, предсједник Комисије.
2. Проф. др Сениша Ристић, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет у Фочи, члан Комисије.
3. Проф. др Драгана Вучевић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, члан Комисије.

Резервни члан:

1. Доц. др Тања Цопалић, ужа научна област Имунологија, Медицински факултет у Нишу, резервни 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 |
|--|

<p>Урађена докторска дисертација, којом су испитиване фенотипске и функционалне карактеристике супресорских ћелија мијелоидног порекла (engl. <i>myeloid derived suppressor cells</i> -MDSC) диферентованих <i>in vitro</i> из хуманих моноцита периферне крви, обрађује актуелну проблематику која је са научног аспекта веома значајна. Иако је применом имуноterapiје базиране на блокади контролних тачака, од 2011. године, проценат преживљавања пацијената са различитим врстама малигних тумора значајно већи (30-40%) у односу на раније кориштену хемотерапију, већина пацијената са малигнитетима не реагује на ову терапију, док једна трећина релапсира. MDSC су, због своје супресивне функције, препознате као најважнији узрок неефикасног имуноског одговора према тумору, чак и након блокирања контролних тачака и</p>
---

<sup>1</sup>Комисија има најмање три члана од којих најмање један није у радном односу на Универзитету

представљају значајан лимитирајући фактор за ефикасност терапије. Кандидат наводи да је до сада предложено више протокола за диференцијацију М-MDSC, субпопулације MDSC, из хуманих моноцита периферне крви. Ови протоколи се базирају на примени фактора стимулације гранулоцитних/макрофагних колонија (engl. *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) у комбинацији са једним од следећих цитокина: интерлеукина (IL)-6, фактора трансформације раста- $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), фактора некрозе тумора  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  и простагландина E2 (PGE2). Међутим, ни једна од поменутих комбинација није довела до индукције М-MDSC које имају фенотип и супресивне функције налик на ове ћелије *in vivo*. С обзиром да до сада нису дефинисани најделотворнији протоколи за добијање ових ћелија из прекурсорских популација *in vitro*, постоји потреба за дефинисањем новог протокола. Кандидат је у свом истраживању показао да додаток PGE2 у комбинацији са GM-CSF и IL-6, у поређењу са истом комбинацијом без додатка PGE2, као и другим комбинацијама предложеним у литератури, доводи до индукције М-MDSC које имају значајно снажније имunosупресивне функције и фенотипски највише одговарају овим ћелијама *in vivo*. Протокол предложен у овој докторској дисертацији може послужити као платформа за додатно проучавање М-MDSC ћелија у циљу бољег разумевања њихових функција и тестирања ефикасности нових имунотерапијских протокола у лечењу малигних тумора.

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

Резултати овог рада су производ оригиналних експерименталних истраживања. Протокол *in vitro* индукције хуманих М-MDSC базиран на примени GM-CSF и IL-6 са додатком PGE2, као и значај појединих молекула из система контролних тачака (IDO-1, ILT-3, ILT-4 и PD1) у имunosупресивном потенцијалу М-MDSC ћелија, испитиван применом блокатора ових молекула, што до сада није рађено, представљају оригиналан научни допринос кандидата.

3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Кандидат је овим истраживањем добио значајне резултате. Морфолошки је окарактерисао испитиване ћелије и показао да додаток PGE2 комбинацији цитокина GM-CSF и IL-6 индукује диференцијацију хуманих моноцита у М-MDSC и потенцира фенотипске и функционалне (супресивне) функције ових ћелија. Такође, додаток

PGE2 значајно редукује проинфламацијска, а потенцира антиинфламацијска својства LPS/IFN- $\gamma$  – стимулираних М-MDSC, потенцира супресивне ефекте М-MDSC на Т ћелије, подстиче њихов капацитет за Th2 поларизацију, а смањује капацитет да индукују настанак Th1, Th17 и цитотоксичних CD8 Т ћелија. Интересантно, М-MDSC добијене применом овог протокола поседују слабији капацитет да индукују конвенционалне регулаторне Т ћелије, а повећан капацитет да индукују регулаторне Т ћелије које продукују IL-10 (Tr1). Такође, кандидат је применом блокатора појединих молекула из система контролних тачака (IDO-1, ILT-3, ILT-4, PD1) показао њихов значај у имуносупресивном потенцијалу испитиваних ћелија.

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

### 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 функције имунских и неимунских компоненти туморске микросредине, улогу имунског надзора тумора, најзначајније облике имуноterapiје тумора, као и принцип деловања имуноterapiје базиране на блокади контролних тачака. Посебно је истакнуто да ова врста terapiје има ефекта код 30-40% пацијената са малигним тумором, а да значајан лимитирајући фактор у ефикасности ове terapiје чине MDSC. Такође, кандидат наводи фенотипске и функционалне карактеристике М-MDSC које у овом моменту признаје научна заједница, мијелопоезу и механизме супресије којима ове ћелије делују у туморској микросредини, као и протоколе за њихову диференцијацију *in vitro*. До сада нису описани протоколи за *in vitro* добијање М-MDSC ћелија које по својим фенотипским и функционалним особинама наликују овим ћелијама *in vivo*. Проблем истраживања, потреба за дефинисањем новог протокола за *in vitro* диферентовање М-MDSC ћелија је јасно истакнут.

### Циљеви

У поглављу циљеви истраживања, који су усаглашени са хипотезом истраживања, кандидат је јасно поставио циљеве истраживања да: окарактерише и упореди фенотип хуманих М-MDSC добијених у присуству GM-CSF, IL-6 и PGE2 са фенотипом ових ћелија добијених применом GM-CSF/IL-6 протокола; испита

<sup>2</sup>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 прилазу доказивања тврдњи или претпоставки у хипотезама, са обрадом података

стабилност фенотипа и функције M-MDSC добијених наведеним протоколима након стимулације проинфламацијским медијаторима (комбинација LPS и IFN- $\gamma$ ), на нивоу: експресије фенотипских маркера, секреције проинфламацијских, анти-инфламацијских цитокина, и хемокина, капацитета за Th поларизацију имунског одговора и утицаја на индукцију субпопулација Treg; испита значај појединих молекула из система контролних тачака у супресорском потенцијалу M-MDSC.

### **Материјал и методе**

Кандидат је јасно указао на научни метод истраживања у свом раду. Описани су коришћени медијуми и реагенси, процес изолације моноклеарних ћелија, диференцијација хуманих дендритских и M-MDSC из моноцита периферне крви, методологија која је примењена за испитивање морфолошких (припрема цитоспин препарата), фенотипских (анализа на проточном цитометру) и функционалних карактеристика (тестови пролиферације и вијабилности M-MDSC, испитивања алостимулаторног и супресивног капацитета, способност индукције регулаторних T ћелија). У поглављу материјал и методе су прецизно дефинисане статистичке методе за обраду података.

### **Резултати**

Резултати су јасно приказани у виду графикона, правилно обрађени применом адекватних статистичких метода и јасно интерпретирани. Показано је да је протокол базиран на примени GM-CSF/IL-6 индуковао диференцијацију хуманих моноцита периферне крви у ћелије које наликују M-MDSC. PGE2 је значајно потенцирао овај ефекат. GM-CSF/IL-6-индуковане M-MDSC су значајно супримирале пролиферацију PNA-стимулисаних PBMNC (ефекат је био израженији у присуству PGE2). PGE2 је смањивао капацитет матурације и доприносио настанку стабилног, незрелог, фенотипа GM-CSF/IL-6-индукованих M-MDSC. PGE2/GM-CSF/IL-6 протокол је редуковао продукцију про-инфламацијских цитокина, а потенцирао продукцију анти-инфламацијских цитокина у културама LPS/IFN- $\gamma$ -стимулисаних M-MDSC. PGE2 је мењао капацитет GM-CSF/IL-6-индукованих M-MDSC да индукују поларизацију ка различитим типовима Th и настанак различитих субпопулација Treg. Такође, кандидат је истраживао и механизме супресивног потенцијала индукованих M-MDSC и показао значајну улогу IDO-1 у супресорском дјеловању GM-CSF/IL-6-индукованих M-MDSC, а ILT-3 и ILT-4 молекула у супресорском деловању GM-CSF/IL-6/PGE2-индукованих M-MDSC. Такође, показано је да је блокада PD1-PD-1L сигналног пута повећала капацитет GM-CSF/IL-6-индукованих M-MDSC, али не и GM-CSF/IL-

6/PGE2-индукованих M-MDSC, да индукују настанак CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> Treg.

### **Дискусија**

Кандидат стручно и са пуно познавања предмета истраживања коментарише и анализира добијене резултате, поредећи их са резултатима других студија у којима су испитивани протоколи за *in vitro* индукцију MDSC, улога, значај и механизми деловања M-MDSC.

### **Закључци**

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

### **Литература**

У раду је цитирано 386 библиографских јединица из ове области, правилно наведених у тексту и поглављу Литература.

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

## **5. Научне резултате докторске дисертације**

Израда протокола базираног на примени GM-CSF и IL-6 са додатком PGE2 у индукцији хуманих M-MDSC, дефинисање њихових фенотипских и функционалних карактеристика, као и значај појединих молекула из система контролних тачака идентификованих на M-MDSC (IDO-1, ILT-3, ILT-4 и PD1) у имуносупресивном потенцијалу ових ћелија представља оригиналан научни допринос кандидата.

## **6. Примјењивост и корисност резултата у теорији и пракси<sup>3</sup>**

Према подацима Министарства здравља и социјалне заштите Републике Српске, у 2017. години је било 27.083 оболелих од малигнух болести. Годишње се региструје око 6000 новооболелих, а морталитет је у сталном порасту. Вриједности ових бројева упућују на хитну потребу за бољим опцијама превенције, дијагностике и лечења оболелих, нарочито уколико је карцином метастазирао. Резултати из ове докторске дисертације ће дати допринос формирању нове платформе за убрзани развој стратегија у имунотерапији тумора. Развој новог *in vitro* модела за диференцијацију

<sup>3</sup> Истаћи посебно примјенљивост и корисност у односу на постојећа решења теорије и праксе

M-MDSC из моноцита периферне крви би могао бити један од путева за откривање ефикаснијих стратегија за имунотерапију солидних тумора. Коначни циљ свих ових истраживања је помоћ у лечењу пацијената оболелих од малигних тумора.

7. Начин презентирања резултата научној јавности<sup>4</sup>

Др Бојан Јоксимовић је део резултата свога истраживања приказао на 5. Европском конгресу имунолога, одржаном у Амстердаму, Холандији у септембру 2018. године, и објавио рад *in extenso* у часопису *Frontiers of Immunology* у марту 2019. године (IF: 5.511).

8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ<sup>5</sup>

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом „Фенотипске и функционалне карактеристике хуманих мијелоидних супресорских ћелија диферентованих *in vitro* од моноцита под утицајем фактора стимулације гранулоцитних/макрофагних колонија, интерлеукина 6 и простагландина Е2“, 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 представљају велики 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 Бојану Јоксимовићу, којом ће стећи звање доктора медицинских наука.

Мјесто: Фоча

Датум: \_\_\_\_\_

Комисија:

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

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

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

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

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

Издвојено мишљење<sup>6</sup>:

1. \_\_\_\_\_, у звању \_\_\_\_\_ (НО \_\_\_\_\_, УНО \_\_\_\_\_),  
Универзитет \_\_\_\_\_,  
Факултет \_\_\_\_\_ у \_\_\_\_\_, члан Комисије;

---

---

<sup>6</sup>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)