

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-191, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата Саре Ракочевић под насловом "Анти-инфламаторна и имуномодулаторна својства дапсона у хуманим ћелијама периферне крви, *in vitro*" (у даљем тексту: Комисија)<sup>1</sup> у следећем саставу:

1. Проф. др Николина Елез-Бурњаковић, ванредни професор, ужа научна област Хумана генетика, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, председник комисије;
2. Проф. др Иван Радић, ванредни професор, ужа научна област Патолошка физиологија, Медицински факултет Косовска Митровица, Универзитет у Приштини, члан комисије;
3. Доц. др Милош Васиљевић, доцент, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, члан комисије.

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

### **ИЗВЈЕШТАЈ** **о оцени урађене докторске дисертације**

1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области
Урађена докторска дисертација, којом су испитивана анти-инфламаторна и имуномодулаторна својства дапсона, обрађује актуелну проблематику која је са научног аспекта веома значајна.  Дапсон је синтетички антибиотик и хемијски аналог сулфапиридина који је првобитно коришћен као анти-микробни агенс, али је касније откривено да има и анти-инфламаторна својства. Његова примена као прва линија терапије у лечењу лепре започела је пре више од шест деценија, а данас се користи и за лечење инфекција <i>Pneumocystis jirovecii</i> и <i>Toxoplasma gondii</i> код пацијената са AIDS-ом. Дапсон делује као антагонист пара-аминобензоичне киселине, смањујући синтезу дихидрофолне киселине која је потребна за раст бактерија. С временом су откривена и његова анти-инфламаторна својства, што га чини ефикасним у

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

лечењу хроничних запаљенских болести коже, као што су неутрофилне дерматозе. Иако је механизам анти-инфламаторног дејства дапсона још увек непознат, бројне студије су показале да он инхибира NF- $\kappa$ B пут и смањује продукцију проинфламаторних цитокина. Истраживања на животињским моделима показала су да дапсон смањује упале у разним органима, као што су црева, желудац и плућа. Он такође смањује оштећења ткива изазвана стресом, исхемијом и реперфузијом. Поједина истраживања су показала да дапсон утиче на функцију неутрофила, смањујући хемотаксу и адхезију, што доводи до смањења инфламације. Такође, он има антиоксидативна својства и може инхибирати продукцију реактивних кисеоничних врста (ROS). Недавне студије су указале да дапсон може смањити ниво проинфламаторних цитокина као што су фактор некрозе тумора  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлеукин 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), и интерлеукин 6 (IL-6), али тачан механизам ових ефеката није у потпуности разјашњен. Упркос значајним резултатима, потребна су даља истраживања како би се боље разумели сви аспекти деловања дапсона, посебно у контексту неутрофилних дерматоза и адаптивног имунског одговора. Кандидаткиња је као основни модел користила неутрофилне гранулоците периферне крви и дендритске ћелије добијене из моноцита периферне крви (MoDC).

Дапсон је, у нецитотоксичним концентрацијама, показао значајну имуномодулацијску активност на неутрофилним гранулоцитима. Инхибирао је продукцију ROS-ова и IL-8, као и ослобађање NET-ова, у културама неутрофила стимулираних са форбол-12-меристат-13-ацетат (PMA), формилметионин-леуцин-фенилаланин (fMLP) и калцијум јоноформ (CaI), као и цитокинима као што су TNF- $\alpha$  и IL-8. Поред тога, дапсон је смањио експресију површинских молекула као што су CD11b, CD18, CD66 и CD89, а стимулише експресију CD16, CD32, CD62 и CD181, што резултује смањењем активације и ефекторске функције неутрофилних гранулоцита. Ови ефекти указују на потенцијал дапсона у регулисању упалних одговора путем модулације функције неутрофилних гранулоцита. Дапсон је додаван у културу моноцита на почетку диференцијације MoDC. Кључни резултат који је добијен у овим истраживањима је да дапсон испољава снажан имуномодулацијски одговор на Т лимфоците, пре свега тако што утиче на диференцијацију и сазревање MoDC. Последица тога било је смањење капацитета MoDC да индукују Th1, Th2, Th17 и Treg

ћелија. Наведени механизам је праћен измењеном продукцијом про-инфламаторних и анти-инфламаторних цитокина.

Због тога се може рећи да је оригиналност овог рада управо садржана у наслову ове тезе да дапсон у приказаним *in vitro* моделим испољава анти-инфламацијска и имуномодулацијска својства што отвара перспективе његове нове примене у терапији аутоимунских и хроничних запаљенских болести.

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

Кандидаткиња је коришћењем модела неутрофилних гранулоцита и кокултуре МоDC и Т ћелија користила најефикасније методе за процену имунског одговора ових ћелија *in vitro*. Користећи напредну и комплексну методологију из области ћелијске биологије и имунологије, добијени су оригинални и значајни резултати који до сада нису били објављени у научној литератури. Оригиналност овог рада лежи у открићу сложеног ефекта дапсона на функцију неутрофилних гранулоцита периферне крви и проширивању постојећих сазнања о његовој способности да смањи продукцију ROS-ова током активације неутрофилних гранулоцита. По први пут је доказано да дапсон инхибира NET-озу. Поред тога, дапсон је променио експресију кључних маркера који су од значаја за функцију неутрофила. Такође, по први пут је показано на моделу МоDC, да дапсон смањује капацитет ових ћелија да у ко-културама са Т ћелијама индукују Th1, Th2, Th17 и Treg ћелијске одговоре.

## 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 дапсон у нетоксичним концентрацијама инхибира продукцију ROS-ова у култури неутрофилних гранулоцита, стимулираних стандардним стимулусима као што су PMA, fMLP и CaI, као и цитокинима TNF- $\alpha$  и IL-8. Дапсон је такође показан као инхибитор процеса NETозе у неутрофилима, што је веома значајан резултат, с обзиром на то да NETоза (ослобађање неутрофилних екстрацелуларних везивних материјала) игра важну улогу у патогенези многих инфламаторних болести. Дапсон је смањио продукцију IL-8 у неутрофилима стимулираним fMLP-ом и цитокинима TNF- $\alpha$  и IL-8, чиме индиректно утиче на редукцију инфламаторне активности ових ћелија. Штавише, дапсон је показао утицај и на експресију различитих површинских молекула на неутрофилним гранулоцитима. Експресију CD11b, CD18, CD66 и CD89 молекула је смањио, док је експресију CD16, CD32, CD628, CD89 и CD181 молекула повећао. Ова измена у експресији ових кључних маркера потврђује својство дапсона да утиче на адхезију и хемотаксу неутрофилних гранулоцита, као и да има снажна анти-оксидативна и анти-инфламаторна својства.

На моделу moDCs, дапсон је смањио експресију CD209, маркера који је повезан са анти-инфламаторним својствима дендритских ћелија. У истом контексту, дапсон је утицао на сазревање moDCs, инхибирајући експресију ко-стимулаторних молекула CD86 и хемокинских рецептора CCR2 и CCR7, што може утицати на њихову способност да активирају Т ћелије. Поред тога, дапсон је показао способност да инхибира експресију толерогених молекула (PD-L1, IDO-1, TGF- $\beta$  и IL-10) на moDCs, као и да стимулише продукцију IL-27, чиме је потенцијално утицао на супресију инфламаторних одговора. Истовремено, дапсон је инхибирао продукцију про-инфламаторних цитокина као што су TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 и IL-23, што додатно подржава његову антиинфламаторну улогу. Када су у питању Th ћелије, дапсон је утицао на смањење капацитета moDC да индукују поларизацију Th1, Th2, Th17 и Treg ћелија, као и на смањење продукције FoxP3+ Treg ћелија, што указује на могућност модулације имунског одговора у правцу смањења инфламације.

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

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

## **Увод**

У поглављу Увод кандидаткиња даје приказ до сада познатих чињеница из литературе које су у непосредној вези са темом докторске дисертације. У уводу се говори о дапсону и његовим анти-бактеријском и анти-инфламаторном деловању, као и о потенцицијалним штетним ефектима током терапијске примене. Такође, у остатку увода кандидаткиња описује различите аспекте функционисања неутрофилних гранулоцита, дендритских ћелија и Т ћелија, као што су њихова диференцијација, фенотип и ефекторски механизми.

## **Циљеви**

У овом поглављу, кандидаткиња је на основу постављених хипотеза јасно дефинисала циљеве истраживања. На основну хипотезе да нецитотоксичне концентрације дапсона мењају фенотипске и функционалне карактеристике хуманих неутрофилних гранулоцита периферне крви, *in vitro*, кандидаткиња је поставила следеће циљеве истраживања: Испитати цитотоксични ефекат дапсона на *in vitro* моделу хуманих неутрофилних гранулоцита периферне крви, одређивањем процента апоптотичних и некротичних ћелија; Испитати фенотипске и функционалне карактеристике хуманих неутрофила периферне крви у присуству нецитотоксичних доза дапсона. На основну хипотеза да нецитотоксичне концентрације дапсона модулишу фенотипске карактеристике незрелих и зрелих хуманих дендритских ћелија моноцитног порекла (MoDC), *in vitro*, кандидаткиња је поставила следеће циљеве истраживања: Испитати дозно зависни цитотоксични ефекат дапсона на *in vitro* моделу MoDC, одређивањем процента апоптотичних и некротичних ћелија; Испитати фенотипске и функционалне карактеристике MoDC диферентованих у присуству дапсона; Испитати ефекат нецитотоксичних концентрација дапсона на продукцију цитокина; На основну хипотеза да нецитотоксичне концентрације дапсона модулишу својства moDC да обликују Т помоћнички (Th) одговор, *in vitro* кандидаткиња је поставила следеће циљеве истраживања Испитати утицај дапсоном третираних MoDC на пролиферацију и поларизацију алогених Т лимфоцита; Испитати ефекат нецитотоксичних концентрација дапсона на продукцију цитокина;

## **Материјал и методе**

У овом делу текста, кандидаткиња је детаљно описала методолошки приступ који је применила у свом истраживању, базирајући се на прихваћеном научном методу у области имунологије. Кандидаткиња је обезбедила све потребне етичке услове за спровођење студије: добијена је сагласност од Етичког одбора Медицинског факултета у Фочи, као и информисани пристанак од стране здравих добровољних давалаца. Ово је кључно за осигурање етичности и безбедности у научним истраживањима која укључују материјал хуманог порекла.

Кандидаткиња је приказала детаље о свим важним методама и материјалима који су коришћени у истраживању. Наводи се да су коришћени специфични медијуми и реагенси, изолација и култивација ћелија, изолација хуманих неутрофилних гранулоцита из периферне крви, изолација моноклеарних ћелија (PBMNC) из периферне крви, издвајање моноцита и Т лимфоцита методама адхеренце и магнетног сортирања, методологија која је примењена за испитивање цитотоксичности дапсона (анализа апоптозе и некрозе на проточном цитометру), анализа фенотипских карактеристика (анализа на проточном цитометру), као и методе за испитивање функционалних карактеристика неутрофилних гранулоцита (спектофотометријске и флуорометријске технике за анализу продукције цитокина и ROS-ова, мерење NET-озе) и MoDC (анализа цитокина и алогена мешана леукоцитна реакција). Прецизно су дефинисане статистичке методе коришћене за обраду података.

## **Резултати**

Резултати су правилно обрађени применом адекватних статистичких метода, представљени у виду графикана и јасно интерпретирани. У циљу испитивања анти-инфламацијског и имуномодулативног потенцијала најпре је одређен дозно зависни цитотоксични ефекат дапсона на моделу хуманих неутрофилних гранулоцита и MoDC. Цитотоксични ефекат је утврђен само код највеће примењене концентрације дапсона (50 µg/mL). Неутрофилне и MoDC културе су доминантно третиране концентрацијама дапсона од 10 µg/mL и 40 µg/mL.

Дапсон је имао значајан утицај на функцију неутрофилних гранулоцита, смањујући производњу ROS-а након стимулације са PMA, CaI, fMLP и цитокинима. Такође, дапсон је умањио ослобађање NET-ова код неутрофилних гранулоцита стимулираних PMA и CaI, као и продукцију IL-8 у културама стимулираних са fMLP и TNF- $\alpha$ . У погледу експресије површинских маркера, дапсон је смањио експресију површинских молекула као што су CD11b, CD18, CD66 и CD89, док је стимулисао експресију молекула попут CD16, CD32, CD62L, CD89 и CD181, након стимулације са fMLP-ом и цитокинима.

Када су у питању MoDC културе, дапсон је смањио експресију молекула CD209 на незрелим MoDCs у присуству GM-CSF и IL-4. Такође је инхибирао сазревање MoDC ћелија које је индуковано LPS и IFN- $\gamma$ , смањујући експресију ко-стимулаторних молекула CD86, као и хемокинских рецептора CCR2 и CCR7. Дапсон је такође смањио експресију толерогених маркера као што су PD-L1, IDO-1, TGF- $\beta$  и IL-10. Што се тиче производње цитокина, дапсон је значајно смањио производњу проинфламаторних цитокина као што су TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 и IL-23. Када је у питању поларизација T-ћелија, дапсон је смањио капацитет MoDCs да подстакну Th1, Th2, Th17 и Treg одговоре. Такође је смањен капацитет MoDC-ова да индукују FoxP3<sup>+</sup> Treg ћелије, које су кључне за развој имуске толеранце.

## **Дискусија**

Кандидаткиња је на компетентан начин анализирали и коментарисала добијене резултате, поредећи их са резултатима других студија и наводећи сва ограничења свог истраживања.. Посебно су дискутовани потенцијални механизми којима дапсон испољава модулацијске ефекте на параметре фенотипских и функцијских својстава неутрофилних гранулоцита и MoDC, што може бити релевантно за терапијске интервенције у болестима које укључују поремећене имунолошке одговоре, као што су инфламаторне и аутоимунске болести. Дискусија је адекватног обима и детаљна, веома добро документована подацима из литературе и веома компетентно написана.

## **Закључци**

У овом поглављу су јасно наведени најважнији закључци докторске дисертације који представљају конкретне и потпуне одговоре на постављене циљеве истраживања. Закључци јасно указују да се анти-инфламаторни и имуномодулаторни ефекат дапсона испољава смањивањем ефекторске функције неутрофилних гранулоцита као и диференцијацијом МоDC са потенцијалом смањења индукције Th1, Th2, Th17 и регулаторних Т лимфоцита.

## **Литература**

У раду је цитирано укупно 334 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. Научни резултати докторске дисертације

Оригинални научни допринос кандидаткиње у овом истраживању представља: доказивање инхибиторних ефеката дапсона на продукцију ROS-а, цитокина и ослобађање NET-ова у културама хумани неутрофиних гранулоцита, као и на модулацију експресије површинских молекула који су укључени у њихову активацију. Такође, дапсон модификује процес сазревања дендритских ћелија моноцитног порекла, инхибирајући експресију ко-стимулаторних молекула и хемокинских рецептора, те смањује капацитет за поларизацију Th одговора и индукцију FoxP3+ Treg ћелија. Ови резултати указују на потенцијалну примену дапсона у регулисању имунског одговора, што би могло проширити индикације у коришћењу дапсона у третирању болести код којих је у процесу настанка и прогресије укључена аутоинфламација и аутоимуност.

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

Истраживања спроведена у оквиру ове дисертације доприносе расветљавању механизма деловања дапсона у контексту модулације имунског одговора. Кроз истраживање ефеката дапсона на неутрофиле и дендритске ћелије, као и на поларизацију Th лимфоцита, показано је да овај лек може модулисати кључне аспекте имунског одговора, смањујући инфламацију и инхибирајући процесе који доводе до оштећења ткива. Дапсон се показао као важан алат у регулацији имунског одговора, што отвара могућности за његову примену у новим терапијским стратегијама, посебно у лечењу стања где је прецизна контрола имунског одговора кључна за успех терапије. Даља истраживања могу додатно осветлити механизме његовог деловања, омогућавајући проширење његове примене на различите болести.

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

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

Виши асистент Сара Ракочевић је део резултата из овог истраживања презентовала на Европском конгресу имунолога одржаном online формату у септембру 2021. године. Кандидаткиња је објавила оригинални рад под називом “ Dapsone Alters Phenotypical and Functional Properties of Human Neutrophils *In Vitro*” у часопису *Molecules* (IF: 4.2) у децембру 2024. године.

#### 8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ<sup>5</sup>

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом "Анти-инфламаторна и имуномодулаторна својства дапсона у хуманим ћелијама периферне крви, *in vitro*", комисија је једногласно закључила да је кандидаткиња изабрала актуелну и оригиналну тему истраживања. Истраживање је спроведено уз поштовање свих принципа научног рада, уз примену савремених метода испитивања и анализе резултата. Добијени резултати, који су оригинални у садржају и интерпретацији, представљају значајан допринос савременој медицинској науци, посебно у области имунологије.

На основу овога, 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 кандидаткиње Саре Ракочевић, која ће тако стећи звање доктора медицинских наука.

Место: Фоча

Датум: 11.04.2025. године \_\_\_\_\_

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. Проф. др Николина Елез-Бурњаковић, ванредни професор, ужа научна област Хумана генетика, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, председник комисије.

---

2. Проф. др Иван Радић, ванредни професор, ужа научна област Патолошка физиологија, Медицински факултет Косовска Митровица, Универзитет у Приштини, члан комисије.

---

3. Доц. др Милош Васиљевић, доцент, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, 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).