

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -
БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.09.2021. године, на основу молбе ментора, **др Олгице Ђурковић-Ђаковић**, научног саветника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, и **др Душанке Савић-Павићевић**, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Александра Б. Узелац**, истраживача сарадника на Институту за медицинска истраживања, под насловом: „**Биолошка и молекуларна карактеризација сојева лозе III *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији**“, у саставу:

1. **др Олгица Ђурковић-Ђаковић**, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију
2. **др Душанка Савић-Павићевић**, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет
3. **др Ђорђе Миљковић**, научни саветник, Институт за биолошка истраживања ”Синиша Станковић”, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију
4. **др Ивана Клун**, виши научни сарадник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију
5. **др Вера Николић**, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

На IV редовној седници, одржаној 22.01.2021. године, Наставно-научно веће Факултета је донело одлуку о прихватању теме докторске дисертације Александра Б. Узелац, мастер биолог, докторанд студијског програма Молекуларна биологија, модул: Молекуларна

биологија еукариота под насловом: „**Биолошка и молекуларна карактеризација сојева лозе III *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији**“. Истом одлуком су одређени ментори др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију, и др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Докторска дисертација **Александре Б. Узелац** урађена је у целости на Институту за медицинска истраживања, у Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу Групе за паразитологију са микробиологијом у Центру изузетних вредности за зоонозе преношене храном и векторима. Дисертација је урађена у оквиру пројекта III 41019 Министарства просвете, науке и технолошког развоја под насловом „Контрола инфекција апикомплексним патогенима: од нових места деловања лека до предикције“ чији је руководилац др. Олгица Ђурковић-Ђаковић, а у последњој години је подржана и средствима по уговору МПНТР: **451-03-9/2021-14/200015**.

Докторска дисертација се састоји од 100 нумерисаних страна и 9 уводних које су насловна страна на српском и енглеском језику, страна са подацима о менторима и члановима комисије, захвалница, сажети на српском и енглеском језику и садржај. Текст дисертације се састоји од поглавља: Увод (23 стране), Научна основа и Циљеви истраживања (4 стране), Материјали и Методе (10 страна), Резултати (19 страна), Дискусија (19 страна), Закључци (2 стране) и Литература (15 страна). Прилози на крају текста су: Списак скраћеница, Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (укупно 8 страна).

Дисертација садржи 5 слика у Уводу, и 19 графикона и то 17 у Резултатима и 2 у поглављу Дискусија. Сем тога, дисертација садржи 15 табела и то: 2 у Уводу, 3 у Материјалима и методама и 10 у поглављу Резултати. Поглавље Литература садржи 227 јединица.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** подељено је на две основне целине, **Таксономија, историјат и значај токсоплазмозе и Биологија паразита *Toxoplasma gondii***. У првој целини укратко су представљена најзначајнија сазнања из клиничке праксе о токсоплазмози као болести коју паразит изазива код људи, као и кључни експериментални резултати који су допринели разјашњењу животног циклуса, таксономије и важних биолошких карактеристика организма *T. gondii* у последњих 100 година од његовог открића. Целина коју чини **Биологија паразита *Toxoplasma gondii*** састоји од пет потпоглавља, и то: Животни циклус, Трансмисија, Патогенеза и имунски одговор на инфекцију, Популациона генетика и Вируленција. У тексту Животни циклус укратко је описана структура тахизоита са посебним оствртом на секреторне органеле у апикалном комплексу, и изложени

најважнији подаци о процесу деобе тахизоита и брадизоита, формирању паразитофорне вакуоле и ткивне цисте, конверзије животних облика и процесу егреса. Описане су фамилије секреторних протеина (ROP, GRA, SAG, MIC) као и многи други појединачни протеини који учествују у наведеним процесима, као и досадашња научна сазнања о условима и сигнаlima који су важни за иницијацију или обуставу процеса. Затим је описано сексуално размножавање паразита код дефинитивних домаћина, стварање зигота, а затим формирање и излучавање ооциста и коначно спорулација ооциста у спољашњој средини и стварање спорозоита. У тексту насловљеном Трансмисија наведени су путеви и начини трансмисије паразита између прелазних и дефинитивних домаћина као и начини превенције и контрола трансмисије.

У тексту насловљеном Патогенеза и имунски одговор на инфекцију описани су дисеминација тахизоита кроз организам домаћина, интеракције тахизоита и тахизоитских протеина са имунским ћелијама домаћина као и сигналне каскаде код домаћина које су кључне за иницијацију имунског одговора. Детаљно су описани одбрамбени механизми, посебно истакнуте улоге макрофага, дендритских ћелија као и популација CD8⁺ антиген специфичних лимфоцита и цитокина IL-12 и IFN- γ , док су у оквиру механизма толеранције истакнуте улоге популација CD4⁺ антиген специфичних лимфоцита и цитокина IL-10.

У целини Популациона генетика је представљено актуелно знање о могућој еволуцији и просторној дистрибуцији сродних популација генотипова (лоза) паразита као и диверзитету *T. gondii* на глобалном нивоу. Описане су глобално распрострањене лозе I, II, III, као и лозе локализоване на одређеним континентима, са посебним освртом на разлике у диверзитету популације генотипова са северне хемисфере у односу на јужну, као и дихотомије између популација генотипова који круже у антропогеној у односу на силватичну средину.

У тексту Вируленција описани су досадашњи мишји модели за евалуације вируленције генотипова паразита *T. gondii*. Такође, детаљно је описана генска компонента вируленције која се састоји од пет VIR региона са више стотина гена међу којима су могући маркери вируленције ROP5, SAG3, ROP16, GRA35 и ROP18. Наведени су механизми деловања појединих гена кандидата као и могућ утицај на фенотип вируленције. Сем тога, описани су и механизми који произлазе из биолошких карактеристика појединих генотипова а који могу допринети вируленцији.

У поглављу **Научна основа** су, после кратког прегледа актуелних сазнања о глобалној популационој структури генотипова паразита *T. gondii* истакнути недоступност или непотпуност података из одређених региона у свету, укључујући и Србију. Такође, после кратког прегледа најважнијих сазнања о вируленцији различитих генотипова утврђеној на мишјем моделу и њеним молекуларним основама, истакнуте се и бројне непознанице везане за локалне изолате.

Циљеви дисертације као и задаци за постизање истих дефинисани су у посебном поглављу. Имајући у виду да свеобухватна популациона структура генотипова који

потичу из разних прелазних домаћина из антропогене и сивлатичне средине у Србији није позната, нити су идентификоване лозе нити учесталост генотипова, први циљ је био да се сачини и анализира популациона структура. За постизање овог циља, генотипизирано је 67 сојева изолованих или детектованих у девет врста прелазних домаћина. Посебно је анализирана до сада неиспитивана популациона структура у сивлатичној средини, и то на основу генотипова детектованих у лисицама, златним шакалима и вуковима. Осим тога, циљеви су укључили и анализу биолошких карактеристика генотипова који циркулишу у Србији као и испитивање вируленције и механизма који доприносе вируленцији одабраних изолата.

Поглавље **Материјали и методе** је организовано у више појединачних целина. У делу Материјали описани су начин прикупљања узорака срца дивљих канида, сојеви паразита *T. gondii* који су одабрани за анализу биолошких карактеристика, вируленције и механизма вируленције, као и одабир мишјег модела Swiss Webster за експериментални део који је рађен *in vivo*. Етичке дозволе које су добијене за ова истраживања су наведене у посебном делу текста. У делу Методе описане су све примењене експерименталне процедуре и анализе од изолације сојева *T. gondii*, пропагације и одржавања тахизоита *in vivo* и *in vitro*, преко одржавања линије VERO ћелија и култивације тахизоита у ћелијама, конверзије брадизоита у тахизоит, до анализе фенотипа *in vitro* кроз кинетику инвазије, стопу пролиферације и егрес (литички капацитет). Затим су описане различите методе екстракције нуклеинских киселина (геномске ДНК, тоталне РНК) почевши од припреме суспензије ткива а укључујући преципитацију ДНК ради концентрације. Следе описи метода генотипизације (MnPCR-RFLP). Метода PCR детекције геномске ДНК паразита у реалном времену коришћена је за селекцију позитивних узорака ткива канида за генотипизацију и потврду инфекције након експерименталне инокулације мишева. Потом су описане метода конверзије фракције информационе РНК у комплементарну ДНК и метода утврђивања релативне експресије одређених гена домаћина и миша као и начин анализе (ΔΔCt). Описани су и тестови модификоване аглутинације (МАТ), који је примењен за утврђивање нивоа специфичних антитела IgG класе, као и *Interferon gamma release assay* (IGRA), који је коришћен за утврђивање релативног нивоа експресије IFN-γ у антиген специфичним периферним лимфоцитима. На крају, описана је и ре-инфекција (енгл. *challenge*) високо вирулентним генотипом, која је служила за евалуацију заштитног имунитета. Методе коришћене за статистичке анализе података су описане на крају поглавља.

Поглавље **Резултати** је организовано у пет целина са више потпоглавља. У првој целини насловљеној Популациона структура *T. gondii* графички је приказана популациона структура паразита *T. gondii* у прелазним домаћинима а посебно у дивљим канидама. Уз то су табеларно приказани сви генотипови детектовани у канидама. У целини насловљеној Биолошка карактеризација варијантних генотипова лозе III, табеларно су приказани генотипови четири изолата лозе III, EQ40, EQ39 (ТохоDB#54), K1, G13 као и соја BGD18 (ТохоDB#1) који је служио као контрола, а затим и резултати типизације алела гена

маркера вируленције, ROP5, ROP16, ROP18, GRA15. Приказана је експериментална шема модела инфекције коришћеног за утврђивање вируленције као и резултати анализе преживљавања мишева након инфекције различитим дозама тахизоита, у виду *Kaplan-Meier*-ових крива, као и графиконом на коме су приказане временске тачке у којима је дошло до смртног исхода. Следи приказ резултата укупне смртности до 15. дана као и кумулативног морталитета до 42. дана након инфекције, а потом и резултата евалуације параметара морбидитета, као и максималног броја циста код преживелих мишева и њиховог промера те процене запремине. Затим следи приказ резултата различитих анализа рађених *in vitro*: кинетика инвазије, капацитет инфекције и начин пролиферације у ћелијама, стопа пролиферације након 48 сати и коначно анализа егреса. Последњи резултат у овој целини је графички приказ релативне експресије гена *ENO2* који кодира тахизоитску енолазу. Следећа целина је насловљена Имунски одговор домаћина након инфекције тахизоитима варијантних генотипова лозе III и ту су изложени резултати експресије гена *IL-12p40*, *IFN- γ* и *IL-10* у мозгу и слезини мишева инфицираних испитиваним генотиповима лозе III као и контролним сојем BGD18 (ТохоDB#1) у раној (након 7 дана) и касној инфекцији (након 42 дана). Уз то су приказани и резултати MAT теста 42. дана после инфекције. У следећој целини насловљеној IGRA тест приказани су резултати релативног нивоа експресије *IFN- γ* у периферним лимфоцитима након ре-стимулације антигеном. У целини Преживљавање и анализа имунског одговора домаћина након ре-инфекције шематски је приказан експериментални модел а следе резултати преживљавања, па резултати експресије гена за *IL-12p40*, *IFN- γ* и *IL-10* у мозгу и слезини мишева инфицираних испитиваним генотиповима лозе III као и контролним сојем BGD18 (ТохоDB#1) након ре-инфекције, а ово се поглавље завршава приказом резултата MAT теста.

У поглављу **Дискусија** које се састоји од три тематске целине добијени резултати се разматрају у контексту сазнања из релевантне литературе. У првој целини, Популациона структура паразита *T. gondii* у прелазним домаћинима у Србији, резултати добијени у оквиру дисертације се корелирају са публикованим подацима за Европу па и читав свет. Констатује се доминација лозе II у Србији, али и значајно присуство лозе III, што је карактеристично за јужну Европу. Истиче се такође диверзитет лозе III у Србији који није примећен у другим земљама јужне Европе. Кандидат посебну пажњу посвећује значају генотипова детектованих у дивљим канидама, који представљају прве резултате у Европи за златне шакале, док се налази у лисицама у Србији значајно разликују по диверзитету у односу на друге делове континента. Висок диверзитет популације генотипова *T. gondii* код лисица у Србији објашњава се као резултат храњења из различитих извора у односу на златне шакале код којих је детектована популација генотипова ниског диверзитета, јер се шакали често хране антропогеним отпадом, заправо месом домаћих животиња код којих кружи популација генотипа ниског диверзитета, док су главни извор хране за лисице врло вероватно дивље животиње, а у силватичним срединама, као што је показано и овим истраживањем, кружи популација генотипова високог диверзитета. У следећој целини,

Биолошка карактеризација варијантних генотипова лозе III, разматра се значај резултата добијених *in vivo* и *in vitro* анализама вируленције и механизма који јој доприносе. Генотипови EQ40 и K1 су према кумулативном морталитету класификовани као интермедијарно вирулентни док су EQ39, који је у бази података ToxoDB идентификован као #54, и G13 ниско вирулентни. У оквиру разматрања резултата *in vivo* анализа помиње се одсуство корелације параметара морбидитета са резултатима кумулативне смртности што може бити и одраз индивидуалних разлика у имунском одговору *outbred*-ованих мишева на којима је истраживање рађено. Истакнут је значај биолошке карактеризације *in vitro* као важне компоненте утврђивања механизма вируленције у односу на анализу типова алела гена маркера вируленције, који у овом случају нису допринели идентификацији механизма, јер су били идентични код свих изолата лозе III. Посебно је дискутовано присуство ROP18_{III} код свих изолата лозе III, алела који није експримиран, иако се ROP18 сматра једним од најзначајнијих маркера вируленције. Сем овога, посебан значај је посвећен резултатима анализе литичног капацитета, који су били у сагласности са резултатима кумулативног морталитета, и истакнута је могућност да је литични капацитет одраз више метаболичке активности код вирулентнијих генотипова у односу на ниско вирулентне. На основу резултата експресије гена ENO2, који кодира тахизоитску енолазу док ENO1, који кодира брадизоитску енолазу није био експримиран, кандидат предлаже да би одржавање више метаболичке активности тахизоита током дужег временског периода код вирулентнијих у односу на ниско вирулентне сојеве могао бити механизам који доприноси вируленцији, што указује на могућност да је конверзија тахизоита у брадизоит, која је кључна за енцистацију паразита, временски одложена код вирулентних генотипова. У делу насловљеном Имунски одговор домаћина након инфекције варијантним генотиповима лозе III дискутују се важне импликације резултата експресије гена у раној и касној инфекцији, посебно корелација високе експресије IFN- γ код мишева инфицираних генотипом EQ40 у раној инфекцији са резултатима добијеним *in vitro*, као и изузетно ниска експресија антиинфламаторног цитокина IL-10, која је наизглед карактеристика генотипова лозе III. Такође, изражена је сумња да су одређени антигени пореклом од паразита доступни ћелијама домаћина и након инцистирања, што је евидентно на основу експресије IL-12p40 у мозгу и слезини код мишева у касној инфекцији. Примећено је да општи имунски одговор код мишева не зависи од вируленције генотипа којим је индукована инфекција, на шта указују и резултати MAT и IGRA теста, али да се генотип паразита огледа у специфичним карактеристикама имунског одговора. Чињеницу да су сви мишеви преживели ре-инфекцију вирулентним генотипом објашњава адекватан проинфламаторни имунски одговор код свих мишева, те се вируленција генотипа не манифестује као изостанак или неадекватност имунске заштите домаћина, већ вирулентнији генотипови индукују интензивнији проинфламаторни одговор од ниско вирулентних. Истакнуто је да анализу резултата добијених у експерименталним моделима отежава широка употреба лабораторијских сојева, у овом случају употреба соја RH (ToxoDB#10) за ре-инфекцију, који се генски и фенотипски разликује од природних

изолата, те је потребан опрез у тумачењу резултата. Посебно се анализирају карактеристике природног дефекта у процесу инвазије који је примећен код генотипа G13, које су након ре-инфекције биле евидентне кроз повишене нивое експресије цитокина код мишева инфицираних овим генотипом у односу на све остале након 30 дана, а дискутоване су у контексту одабира стратегије за вакцинацију. Наиме, резултати упућују на опрез у одабиру кандидата за вакцину са дефектима у процесима кључним за инфекцију ћелија домаћина, јер указују на могућност индуковања неадекватних механизма резистенције неопходних за контролу пролиферације тахизоита. Коначно, резултати МАТ теста након ре-инфекције су тумачени у контексту могућих разлика у саставу антигена/епитопа код различитих генотипова који диктирају Т-ћелијски реперотар домаћина.

У поглављу **Закључци** наведено је 15 закључака. Закључено је да је диверзитет генотипова у силватичној средини у Србији висок у односу на диверзитет генотипова у домаћој средини као и да је вируленција многих генотипова из силватичне средине непозната, а да долази до преласка генотипова из силватичне средине у домаћу, што може бити значајно за јавно здравље. Изолати варијантних генотипова лозе III, која чини четвртину структуре у Србији, ретки су у Европи, те су њихове биолошке карактеристике као и спектар вируленције недовољно познати. Закључено је да су изолати EQ40 и K1 интермедијарно вирулентни, док су EQ39 (ТохоDB#54) и G13 ниско вирулентни, а да се вируленција огледа и у биолошким карактеристикама као што су кинетика инвазије, стопа раста и литички капацитет, с тим да је литички капацитет најбоље корелирао са фенотипом вируленције *in vivo*. Могући механизам вируленције који омогућава високу стопу раста и литички капацитет је повишен метаболизам, евидентан кроз експресију тахизоитске енолазе (ENO2), који условљава и интензивнији имунски одговор, евидентан кроз експресију цитокина IFN- γ у раној инфекцији. Вируленција индивидуалних генотипова не утиче на квалитет имунског одговора, већ се огледа кроз његов интензитет, док саме разлике у генотипу условљавају и разлике у имунском одговору које су евидентне у разликама у експресији гена као и у нивоу специфичних антитела IgG класе.

У поглављу **Литература** су наведене 226 библиографске јединице које су адекватно цитиране у тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

- **Uzelac A, Klun I, Ćirović D, Penezić A, Ćirković V, Djurković-Djaković O.** (2019) Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in wild canids in Serbia. *Parasitol Int.* Dec; 73:101973. **M22**, DOI:[10.1016/j.parint.2019.101973](https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101973)

1. **Uzelac A**, Klun I, Ćirković V, Djurković-Djaković O. (2020). In vivo and in vitro virulence analysis of four genetically distinct *Toxoplasma gondii* lineage III isolates. *Microorg.* 8(11):1702 **M21**, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111702>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Uzelac A**, Klun I, Štajner T, Kuruca Lj, Bobić B, Ćirković V, Djurković-Djaković O (2019): Population structure of *Toxoplasma gondii* in Serbia. EURO-FBP Final Meeting: What next, Oeiras, Portugal, 13-14.02. Abstract book, pp. 12-12, **M34**
2. **Uzelac A**, Klun I, Štajner T, Mercier A, Kuruca Lj, Bobić B, Marković M, Djurković-Djaković O (2018): Population structure of *Toxoplasma gondii* in Serbia. 14th International Congress of Parasitology-ICOPA 2018, Daegu, Južna Koreja, 19-24.08. eAbstract book, pp.3204-3206, **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Мишљење и предлог Комисије

На основу анализе докторске дисертације кандидата **Александре Б. Узелац**, комисија сматра да ова дисертација представља оригиналан научни рад који је у сагласности са циљевима истраживања и да испуњава све критеријуме прописане стандардима Универзитета у Београду.

Резултати ове докторске дисертације представљају свеобухватну биолошку и молекуларну анализу варијантних генотипова лозе III *T. gondii* изолованих код дивљих и домаћих животиња и људи у Србији. Испитивање вируленције неких од ових изолата *T. gondii* које је дало увид у спектар вируленције генотипова који круже у овој средини сасвим је оригинално. Сем тога, комплексни методолошки приступ који је укључио испитивања и паразита и домаћина омогућио је свеобухватно сагледавање механизма вируленције како на биолошком тако и на молекуларном нивоу, што представља значајан и оригиналан научни допринос. Добијени резултати су јасно и адекватно приказани, критички дискутовани и изведени су логични закључци. Литературни подаци су адекватно цитирани у дисертацији. Сем научног доприноса, ови резултати могу имати и практичан значај за јавно здравље, а посебно треба поменути да су и важан допринос у примени концепта једног здравља у нашој средини.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидаткињи **Александри Б. Узелац** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Биолошка и молекуларна карактеризација сојева лозе III *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији**”.

КОМИСИЈА:

У Београду, 30.09.2021. године

др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник,
Институт за медицинска истраживања

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Ђорђе Миљковић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања ”Синиша Станковић”,

др Ивана Клун, виши научни сарадник,
Институт за медицинска истраживања

др Вера Николић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет