

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12.07.2019. године, на основу молбе ментора, проф. др Надежде Недељковић, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Марије Ацић**, запослене на Биолошком факултету Универзитета у Београду под насловом: „Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита“, у саставу: др Надежда Недељковић, редовни професор Биолошког факултета – Универзитет у Београду, др Ирена Лаврња, научни саветник ИБИСС, др Ђорђе Миљковић, научни саветник ИБИСС, др Александра Исаковић, редовни професор Медицинског факултета – Универзитет у Београду и др Данијела Лакета, доцент Биолошког факултета-Универзитет у Београду.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска теза Марије Ацић написана је на 157 страна и садржи уобичајена поглавља: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима (Увод – 42 страна; Циљ рада – 2 стране; Материјал и методе – 36 страна; Резултати – 33 стране; Дискусија – 14 страна; Закључци – 2 стране; Литература – 22 стране) и Прилози (Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу и Копије објављених радова). Списак референци садржи 332 референце, а резултати су илустровани схемама (6) и оригиналним композитним сликама (22) и табелама (8).

Анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације, кандидаткиња даје концизан и логичан преглед литературе која се односи на неуроинфламацију и аспекте урођеног и стеченог имунског одговора, а затим детаљно описује ћелијске ефекторе имунске реакције у централном нервном систему (ЦНС), микроглијске ћелије и астроците. Имајући у виду да се докторат бави улогом пуринске сигнализације на астроцитима, детаљно су описане морфолошке и функционалне одлике ових ћелија, а посебно њихова улога у неуроинфламацији, као и нова сазнања о функционалној поларизацији астроцита према А1 или А2 фенотипу, који

се разликује према општим ефектима на ток неуроинфламације. А1 астроцити продукују про-инфламаторне цитокине и друге медијаторе инфламације, чиме продужавају ток и трајање инфламације, док А2 астроцити продукују анти-инфламаторне цитокине и факторе раста, и остварују протективни утицај на ткиво. Затим следи детаљан опис пуринске сигнализације и њених компоненти, сигналних молекула АТФ и аденозина, њихових рецептора, P2 (P2X, P2Y), односно, P1 (A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R и A₃), и ензима ектонуклеотидаза, које преводe АТФ у аденозин у ванћелијском простору. Посебно су описана општа и специфична својства екто-5'-нуклеотидазе (eN/CD73), чија је улога у инфламаторној активацији астроцита и централна тема овог докторског рада. Описане су опште и структурно-функционалне одлике, мембранска и солубилна форма, ензимска својства, као и регулација експресије на генском и пост-транслационом нивоу.

Циљеви докторске тезе презентовани су јасно и концизно: Испитивање утицаја 1) АТФ, и 2) аденозина на морфолошки и функционални фенотип астроцита у контексту А1/А2 поларизације; 3) значај појачане експресије eN/CD73 у настанку реактивних астроцита у контролним условима и у условима блокаде eN/CD73, применом фармаколошке инхибиције (инхибитор активности α,β -метиле ADP - APCP), имунолошке блокаде (анти-eN/CD73 антитела) и генетичке блокаде (утишавање генске експресије применом siRNK); 4) Улога eN/CD73 у миграцији астроцита у условима примењених блокада; и 5) корелирање нивоа експресије eN/CD73 и нивоа главних цитокина, на основу чега би се могао идентификовати превладавајући фенотип астроцита А1 (LPS, IL-1 β , TNF- α) или А2 (IL-6, IFN- γ , АТФ).

Поглавље **Материјал и методе** садржи детаљне описе и протоколе примењених метода и коришћених реагенса. У изради ове докторске тезе кандидаткиња је самостално применила више од 20 аналитичких, биохемијских и молекуларно-биолошких техника, и напредне методе светлосног, флуоресцентног и конфокалног микроскопирања, панел од 30-так примарних и секундарних антитела и флуоресцентних боја, специфичне нуклеотидне прајмере за реакције умножавања иРНК и генско утишавање, поступке модификовања садржаја гликана у зромом молекулу eN/CD73, применом ензимске дегликозилације (PNGaseF) или гајењем ћелија у присуству инхибитора ензима који обављају гликозилацију у ендоплазмином ретикулуму (туникамицин). Описани су протоколи за изоловање, пречишћавање и одржавање примарне културе астроцита, третмани, методе изоловања узорака (мембрана астроцита, лизата астроцита, укупних протеина, укупне РНК), као и детаљи протокола за одређивање активности eN/CD73 (ензимски есеј), нивоа експресије (имуноблот и rtPCR), имунофлуоресцентног обележавања eN/CD73, морфометријске анализе облика, величине ћелија и броја наставака, тест миграције и квантификација миграције. Описане су и бројне друге методе, као што су методе одређивања активности антиоксидативних ензима, математичке методе обраде резултата, статистичке методе и друго.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња је на разумљив и прегледан начин изнела главне налазе своје докторске тезе, које је веома ефектно илустровала композитним

сликама, које садрже графичке и табеларне приказе и микрографије. Представљени су резултати који се односе на утицај АТР и аденозина на астроците. На основу бројних параметара је уочено да АТР усмерава астроците према протективном А2 фенотипу, док аденозин делује анти-инфламаторно и подстиче мирујући фенотип ћелија. Такође је показано да је активација астроцита праћена повећањем експресије eN/CD73, на генском, протеинском и функционалном нивоу, као и редистрибуцијом молекула по површини ћелија. Кандидаткиња је показала да eN/CD73 има улогу мембранског сензора за сигнале који долазе са ванћелијског матрикса, као и да блокада овог молекула применом различитих блокатора на специфичан начин делује на општу ћелијску физиологију, пролиферацију и миграцију. Блокада активности помоћу APCP инхибитора, анти-eN/CD73 антитела или генетичким утишавањем смањује активност eN/CD73, али и стопу пролиферације астроцита у култури. Примена анти-eN/CD73 антитела доводи до исецања GPI сидра којим је eN/CD73 везана за површину мембране и ослобађања функционалног протеина у медијум. Инхибиција APCP-ом и блокада антителом активирају унутарћелијску каскаду посредовану ERK1/2 сигнализацијом. Тестови миграције показују да присуство eN/CD73 појачава адхезију ћелија за подлогу, највероватније посредством интеракције са протеинима ванћелијског матрикса, док уклањање eN/CD73 или блокада подстичу ослобађање астроцита са подлоге и њихову миграцију. Такође је показано да проинфламаторни цитокини IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, АТР и LPS директно подстичу експресију eN/CD73 у условима инфламације и да доводе до пост-транслационих промена које се очитују у промењеном обрасцу или нивоу гликозилације зрелог eN/CD73 протеина. У контексту А1/А2 поларизације, резултати указују да и цитокини који поларизују астроците према А1 фенотипу, као и они који их поларизују према А2 фенотипу, изазивају повећање експресије eN/CD73, што наводи на закључак да је повећање експресије eN/CD73 општа одлика реактивних астроцита, без обзира на њихов фенотип.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња је сумирала своје резултате и ставила их у контекст доступне литературе, коју сачињава 332 цитиране референце. Дискусија резултата показала је зрелост кандидаткиње да објективно сагледа добијене резултате, и да укаже на њихов потенцијални значај у контексту неуропатологија праћених хроничном активацијом астроцита, и значајем промењене експресије eN/CD73.

У одељку **Закључци**, кандидаткиња је сумирала своје налазе у виду 5 концизних и једног начелног закључка:

1. Ванћелијски АТР изазива активацију астроцита и усмерава их у правцу неуропротективног А2 фенотипа.
2. Ванћелијски аденозин подстиче одржавање мирујућег фенотипа астроцита;
3. eN/CD73 има улогу мембранског сензора за ванћелијске сигнале који мењају бројне аспекте физиологије астроцита.
4. eN/CD73 подстиче адхезију астроцита за подлогу и смањује миграцију, продукцијом аденозина и својим адхезионим својствима.

5. Проинфламаторни цитокини директно регулишу експресију eN/CD73 у астроцитима на генском нивоу и мењају образац гликозилације зрелог протеина.

На основу свега је изведен начелни закључак да eN/CD73 има специфичне улоге у процесу активације астроцита, јер се усходна регулација овог ензима јавља код свих реактивних астроцита независно од њихове функционалне поларизације. Имајући у виду улогу eN/CD73 у продукцији аденозина, у интеракцијама ћелија са подлогом као и преносу ванћелијских сигнала и активацији унутарћелијских сигналина путева, модулација експресије и активности eN/CD73 путем фармаколошке, имунолошке и/или генске интервенције може бити потенцијал терапеутски приступ у болестима ЦНС.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Adzic M**, Nedeljkovic N. (2018) Unveiling the Role of Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 in Astrocyte Migration by Using Pharmacological Tools. *Front Pharmacol.* 2018 Mar 1;9:153. doi: 10.3389/fphar.2018.00153. eCollection 2018. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00153/full> (M21) (*Pharmacology*: 33/257; IF₂₀₁₆= 4.400)
2. **Adzic M**, Stevanovic I, Josipovic N, Laketa D, Lavrnja I, Bjelobaba IM, Bozic I, Jovanovic M, Milosevic M, Nedeljkovic N. (2017) Extracellular ATP induces graded reactive response of astrocytes and strengthens their antioxidative defense in vitro. *J Neurosci Res.* Apr;95(4):1053-1066. doi: 10.1002/jnr.23950. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.23950> (M22) (*Neuroscience*: 131/256; IF₂₀₁₅=2.689).
3. Brisevac D, **Adzic M**, Laketa D, Parabucki A, Milosevic M, Lavrnja I, Bjelobaba I, Sévigny J, Kipp M, Nedeljkovic N. Extracellular ATP Selectively Upregulates Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 and Ecto-5'-Nucleotidase by Rat Cortical Astrocytes In Vitro. *J Mol Neurosci.* 2015 Nov;57(3):452-62. doi:10.1007/s12031-015-0601-y. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12031-015-0601-y>. (M23) (*Neuroscience*: 159/252; IF 2.343).

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Adzic M**, Nedeljkovic N. The distinct carbohydrate content is responsible for differences in enzymatic and adhesive properties of eN/CD73 in rat cortical astrocyte cultures when exposed to factors commonly upregulated in states of brain injury, inflammation or degeneration. 13th Göttingen Meeting, 20-23 March 2019, Book of Abstracts, T12-3C.
2. **Adzic M**, Nedeljkovic N. Ecto-5'-nucleotidase mediates migration of rat cortical astrocytes in scratch wound assay in vitro. 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. Göttingen, Germany, 22-25 March 2017. T12-6A, Proceedings p. 587.

3. **Adžić M**, Laketa D, Saric A, Jovanovic M, Lavrnja I, Nedeljkovic N. Cell adhesion, migration and neuroimmunoregulation role of astrocyte-specific ecto-5'-nucleotidase/CD73 expression and activity. 7th Joint Italian-German Purine Club Meeting - "Advances in Basic and Translational Purinergic Research", 20-22 July 2017. Book of abstracts p. 76. Published in: Purinergic Signalling – Abstracts from the 2017 Italian – German Purine Club Meeting, Springer, 13, 4, pp. 629 - 681, 1573-9538, 10.1007/s11302-017-9581-4

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Adžić M**, Nedeljkovic N. The blockade or lack of CD73 increases the migration of astrocytes in vitro, independent of CD73 catalytic activity. VII Serbian Neuroscience Society congress with international participation, Belgrade, 25-27 October 2017. (A21), P: 67.

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Марије Б. Аџић Б3054/2012 послата је 02.07.2019. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 03.07.2019.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита“, кандидаткиње Марије Б. Аџић, констатовано је да подударане текста износи **7%** уз искључена преклапања цитата и библиографских података о коришћеној литератури. Овај степен подударности условљен је преклапањем личних имена и општих научних термина, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере подударности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду Комисија је утврдила да извештај указује на оригиналност докторске дисертације „Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита“, аутора Марије Б. Аџић, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Сагледавајући докторски рад кандидаткиње Марије Аџић, резултате њених истраживања, као и публикације које су директно произашле из њеног експерименталног рада, Комисија је закључила да је докторска теза дала важан и оригинални научни допринос разумевању улоге пуринске трансмисије у неуроинфламацији генерално, као и испитивању улоге екто-5'-нуклеотидазе/CD73 у инфламаторној активацији астроцита и њиховој миграцији. Постигнути резултати могу имати и шири значај, имајући у виду да се слична дерегулација eN/CD73 уочава и на метастатским канцерским ћелијама, чија је основна карактеристика нежељена миграција. Сви добијени резултати указују да би eN/CD73, самостално или у комбинацији са блокаторима аденозинских рецептора, могла бити мета фармаколошке модулације у неуродегенеративним болестима. О значају резултата

сведоче и радови објављени из тезе (1×M21 + 1×M22+1×M23), који су за кратко време цитирани 15 пута.

Стога, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да прихвати позитиван извештај о докторској тези **Марије Ацић** под насловом „Улога екто-5'-нуклеотидазе (CD73) у инфламаторној активацији и миграцији астроцита“ и да га проследи Већу области природних наука Универзитета у Београду на усвајање, чиме ће се испунити сви формални услови за јавну одбрану.

У Београду, 16.07.2019. године

КОМИСИЈА:

др Надежда Недељковић, редовни професор
Биолошки факултет-Универзитет у Београду

др Ирена Лаврња, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
- Универзитет у Београду

др Ђорђе Миљковић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
- Универзитет у Београду

др Александра Исаковић, редовни професор
Медицински факултет- Универзитет у Београду

др Данијела Лакета, доцент
Биолошки факултет - Универзитет у Београду