

НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Научног већа Медицинског факултета у Београду, одржаној дана 11.01.2022. године, број 11/III-3/6-СБ, именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

**„ Испитивање модулације сенесценције индуковане хидроксиуреом на модел
систему хуманих мезенхималних стромалних ћелија “**

кандидата др Сунчице Бјелице, запослене у КБЦ „Др Драгиша Мишовић-Дедиње“, Универзитета у Београду. Ментор ове докторске тезе је проф. др Милица Радојковић, коментор је др. сци. Хуан Ф. Сантибањез.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Проф.др Марија Пљеша-Ерцеговац, редовни професор Медицинског факултета, Универзитет у Београду
2. Проф.др Милош Марковић, редовни професор Медицинског факултета, Универзитет у Београду
3. Проф.др Владимир Јуришић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Након детаљне анализе приложене докторске дисертације, консултација са ментором, коментором и кандидатом, чланови комисије за оцену завршене докторске дисертације једногласно подносе Научном већу Медицинског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација др Сунчице Бјелице написана је на 149 страна и подељена је на следећа поглавља: увод, циљеви истраживања, материјал и методе,

резултати, дискусија, закључци и литература. У дисертацији се налази укупно 45 слика, 4 табеле и 375 цитата из научних часописа. Докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику, биографију кандидата и податке о комисији.

У **Уводу** су издвојене 4 целине и садржи 5 слика. Прва и друга целина се односе на карактеристике матичних ћелија, са посебним освртом на мезенхималне стромалне ћелије, које су предмет истраживања ове докторске дисертације. Анализирани су методе изолације ових ћелија из различитих ткива, као и њихова карактеризација према критеријумима Комитета за мезенхималне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију. Потом је дат преглед најзначајнијих улога ових ћелија укључујући имуномодулацију, туморогенезу и мијелофиброзу. Трећи део се бави хидроксиуреом као једним од значајних антинеопластичних агенаса који се користи у терапији хематолошких малигнитета укључујући леукемије и мијелопролиферативне неоплазме. Затим су објашњени структура и познати механизми деловања хидроксиуреа као и утицај овог цитостатика на ћелијски циклус различитих типова ћелија. Наведене су и индикације за примену хидроксиуреа, позната сазнања о ефикасности лека у терапији малигну и немалигну болести, као и сазнања о токсичности коју прати терапејска примена лека. С обзиром да је познато да хидроксиуреа доводи до сенесценције како малигно трансформисаних ћелијских линија, тако и примарних ћелија, у четвртом делу су анализирани карактеристике сенесцентних ћелија. Описани су фактори који доводе до сенесценције попут оксидативног стреса, скраћења теломера, оштећења ДНК, митохондријалне дисфункције, активације онкогена и инфламације. У последњем делу изнети су сви значајни интраћелијски и екстраћелијски маркери сенесценције као и неопходност коришћења комбинација ових маркера ради што прецизније детекције сенесцентних ћелија.

Циљеви истраживања су јасно и прецизно дефинисани. Обухватају изолацију мезенхималних стромалних ћелија из костне сржи и периферне крви здравих давалаца и испитивање њихових фенотипских карактеристика и способности диференцијације, а потом и испитивање *in vitro* утицаја хидроксиуреа на индукцију сенесценције ових ћелија анализом сенесцентних маркера. Следећи сегмент истраживања је испитивање

утицаја сенесценције индуковане хидроксиуреом на пролиферацију Т лимфоцита и индукцију мијелоидних супресорних ћелија, као и на пролиферацију малигнух JAK2 V617F позитивних ћелија и улогу ROS (енг. *reactive oxygen species*) и TGF- β 1 (енг. *transforming growth factor beta 1*) у овом процесу. Наредни циљ дефинисан у овој дисертацији је анализа ефекта хидроксиуреа на TGF β 1 индуковану експресију профибротичног фенотипа ових ћелија.

У поглављу **Материјал и методе** јасно су описане све коришћене методе у различитим сегментима истраживања. Описан је метод изолације мезенхималних стромалних ћелија из периферне крви и костне сржи као и њихова карактеризација на основу критеријума Комитета за мезенхималне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију. Утицај хидроксиуреа на индукцију сенесценције испитан је детекцијом морфолошких промена инвертном светлосном микроскопијом, док је сенесцентни маркер β -gal (енг. *β -galactosidase*) детектован цитохемијским бојењем. Експресија сенесцентних маркера p16^{INK4}, p21^{Cip1}, γ H2A.X детектована је имунофлуоресцентним бојењем. Ћелијски циклус је анализиран након бојења ћелија пропидијум јодидом, анексином V и бром-деоксиуридином методом проточне цитометрије. Хидроксиуреом третиране ћелије су анализирани *Western blot* анализом којом је детектована фосфорилација сигналних молекула значајних за ћелијску пролиферацију и фиброзу као што су MAPK (p38, ERK), JAK/STAT, mTOR, SMAD3. Продукција ROS и NO (енг. *nitric oxide*) процењена је коришћењем флуоресцентних боја и методом проточне цитометрије. Продукција TGF- β 1 мерена је ELISA методом и квантитативном PCR методом у реалном времену. Ефекат сенесцентних ћелија на малигне ћелије као и њихова имуномодулаторна улога испитани су проточном цитометријом. Хидроксиуреом третиране ћелије су анализирани на експресију фибробластног α SMA маркера имунофлуоресцентном методом. Добијени резултати су статистички обрађени у у виду слика, графикона и табела у статистичким програмима SPSS и GraphPad Prism. Статистичка обрада резултата извршена је применом параметријских и непараметријских тестова.

У поглављу **Резултати** детаљно су описани и приказани сви добијени резултати. Ово поглавље укључује и 37 слика допуњених текстуалним објашњењима.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз упоредну анализу добијених резултата истраживања и податке истраживања других аутора на основу којих су изведени адекватни закључци. Резултати који су добијени по први пут су објашњени на одговарајући начин.

Закључци су изведени из најважнијих резултата који су у складу са дефинисаним циљевима. Коришћена **Литература** садржи списак од 375 библиографских јединица, које су цитиране ванкуверским стилем.

Б) Провера оригиналности докторске дисертације

На основу налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Испитивање модулације сенесценције индуковане хидроксиуреом на модел систему хуманих мезенхималних стромалних ћелија**”, аутора Сунчице Бјелице, утврђено подударане текста износи 5% (*Similarity index* је 5%). Овај степен подударности је последица библиографских података о коришћеној литератури, тзв.општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду ("Гласник Универзитета у Београду" број 201/18).

В) Кратак опис постигнутих резултата

Резултати ове студије су показали да су мезенхималне стромалне ћелије изоловане из костне сржи и периферне крви, имале карактеристике мезенхимских стромалних ћелија а то су адхерентност за пластику, експресија мезенхималних стромалних маркера уз одсуство хематопоеетских површинских антигена и способност диференцијације ка остеобластима и адипоцитима. Генотоксични ефекат хидроксиуреа на мезенхималне стромалне ћелије доказан је на основу експресије γ H2A.X и детекције микронуклеуса, што је надаље водило ка смањењу пролиферације ових ћелија и застоју ћелијског циклуса у S фази. Застој у ћелијском циклусу није праћен повећањем у броју

апоптотичних ћелија али је проузроковао сенесценцију мезенхималних стромалних ћелија што је показано анализом ћелијске морфологије, сенесцентне β -галактозидазе и експресије p16^{INK4a} након третмана ових ћелија хидроксиуреом. Сенесценција ових ћелија је посредована повећањем продукције ROS, а овај ефекат је демонстриран након третмана хидроксиуреом и антиоксидансима апоцинином и NAC (енг. *N-acetyl cysteine*) који су довели до инхибиције сенесцентног фенотипа. У складу са показаним цитостатским ефектом хидроксиуреа, показано је да третман мезенхималних стромалних ћелија овим агенсом доводи до смањења активације пролиферативних mTOR, MAPK и JAK/STAT сигналних путева. Такође, третман хидроксиуреом је утицао на диференцијациони потенцијал мезенхималних стромалних ћелија доводећи до смањења диференцијације ка оцтеобластима и адипоцитима. Анализа *bystander* ефекта хидроксиуреом индукованих мезенхималних стромалних ћелија је спроведена гајењем ових ћелија у кокултури са JAK2-V617F позитивним хуманим еритролеукемијским ћелијама 92.1.7 (HEL) и BCR/ABL позитивним K562 ћелијама. Сенесцентне мезенхималне стромалне ћелије су су инхибирале пролиферацију *bystander* HEL ћелија путем повећане продукције ROS и TGF- β 1, док нису имале утицај на пролиферацију K562 ћелија. У даљем току испитан је утицај хидроксиуреа на имуномодулаторне карактеристике мезенхималних стромалних ћелија. Хидроксиуреом тертиране ћелије су смањиле пролиферацију Т лимфоцита уз очуван капацитет индукције моноцитних мијелоидних супресорних ћелија. Такође, сенесцентне мезенхималне стромалне ћелије су демонстрирале и смањену осетљивост на профибротични ефекат TGF β 1 услед смањење експресије TGF β 1 рецептора и редуковане фосфорилације SMAD3 након третмана хидроксиуреом. Овај ефекат је показан на основу смањене TGF β 1 индукције α SMA позитивних миофибробласта од мезенхималних стромалних ћелија а након индукције сенесценције хидроксиуреом.

Наведени подаци могу бити од значаја у разумевању хидроксиуреом индуковане превремене сенесценције мезенхималних стромалних ћелија које показују и повећану имуносупресивну функцију, инхибирају пролиферацију туморских ћелија, а испољавају

и смањену осетљивост на профибротични ефекат TGF β 1 и као такве могу имати значај у развоју нових стратегија у лечењу хематолошких малигнитета.

Г) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

Као један од најзначајних модела за изучавање механизма дејства лекова издвајају се ћелијске културе. Мезенхималне стромалне ћелије су једне од најчешће коришћених модел система како у фундаметалним тако и у клиничким истраживањима, а у већини случајева се ради о ћелијама порекла костне сржи и периферне крви (Pittenger и сар., 2019; Levy и сар., 2020). За потребе ове дисертације мезенхималне стромалне ћелије успешно су изоловане из делова кости фемура и периферне крви здравих даваоца, иако је познато да услед смањене адхерентности ћелија након доспевања у циркулацију (Dabiri и сар., 2018), њихова изолација из периферне крви може представљати значајан изазов. Карактеризација изолованих ћелија је извршена према критеријумима Комитета за мезенхималне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију (Dominici M и сар., 2006), по којима су ове ћелије идентификоване као мезенхималне стромалне ћелије на основу морфолошких одлика, имунофенотипског профила и диференцијационог потенцијала.

Као један од најчешће коришћених циторедуктивних агенаса у терапији хематолошких малигнитета издваја се хидроксиуреа. С обзиром да овај хемиотерапеутик има непознат ефекат на микросредину костне сржи у овом истраживању је испитан ефекат хидроксиуреа на карактеристике и функцију мезенхималних стромалних ћелија. Концентрација лека коришћена у оквиру истраживања одговара концентрацији лека у крви која се постиже након терапијске примене хидроксиуреа (Kühr и сар., 2003), а анализом ћелијске вијабилности мезенхималних стромалних ћелија након третмана ћелија терапијским концентрацијама лека, ова концентрација је означена као цитостатска без цитотоксичног ефекта. Према подацима из литературе циторедуктивни ефекат хидроксиуреа заснован је на прекиду синтезе ДНК који води у застој ћелијског циклуса (Young и сар., 1967; Petrova и сар., 2016). Стога је анализирано присуство хетерохроматинских фокуса бојењем на γ H2AX, након третмана мезенхималних стромалних ћелија хидроксиуреом, који је према

результатима овог истраживања довео до повећане експресије ових ДНК ожиљака и формирања микронуклеуса што указује на генотоксични ефекат лека. У даљем току је нализирана пролиферација мезенхималних стромалних ћелија под утицајем третмана хидроксиуреом. Хидроксиуреа је узроковала акумулацију ћелија у S фази ћелијског циклуса уз смањења броја ћелија у G0/G1 фази. Овај ефекат до сада није описан на примарним ћелијама али је познат из истраживања на ћелијским линијама и објашњава се инхибицијом ензима рибонуклеотид-редуктазе који доводи до смањеног допремања дезоксирибонуклеотида (Singh и сар., 2016; Petrova и сар., 2016).

Од раније је познато да застој у ћелијском циклусу узрокован ДНК оштећењем води у превремену ћелијску сенесценцију (Bahl и сар., 2009), па је следећи корак био испитивање испољености сенесцентног фенотипа након третмана мезенхималних стромалних ћелија хидроксиуреом. С обзиром да не постоји један специфичан биомаркер сенесценције, у истраживању су коришћени маркери који су идентификовани као најзначајнији а то су β -gal, p16^{ink4}, p21^{CIP1} и SAPS (Dodig и сар., 2019). На основу повећане експресије ових сенесцентних маркера и типичних морфолошких промене показано је да је третман мезенхималних стромалних ћелија хидроксиуреом довео до сенесценције. Претходним истраживањима идентификован је ROS као један од фактора у инхибицији пролиферације и последичној сенесценцији ћелија (Brandl и сар., 2011; Burova и сар., 2013). Резултати су показали да третман хидроксиуреом доводи до унутарћелијског повећања ROS док је третман антиоксидансима апоцинином и NAC, инхибирао сенесцентни ефекат хидроксиуреа. Механизам којим хидроксиуреа доводи до повећања ROS није довољно испитан. Истраживања на бактеријским ћелијама су показала да у овом процесу има инхибиција ензима супероксид-дисмутаза 2 и митохондријална-деацетилаза Sirt-3 (Zhai и сар., 2017; Dong и сар., 2014), али потребна су даља истраживања да потврде овај ефекат на ћелијама сисара. Истраживања са апоцинином и Rac1 инхибитором у оквиру ове студије дају увид у значај инхибиције NOX у генерисању ROS под утицајем хидроксиуреа.

Да би се испитала унутраћелијска сигнализација након третмана хидроксиуреом, мезенхималне стромалне ћелије су третиране хидроксиуреом а потом је анализирана

активација mTOR, MAPK укључујући ERK, p38 и JNK, као и JAK/STAT. Овај третман довео је до смањења фосфорилације mTOR. Иако је највећи број претходних истраживања показао значај активације mTOR за настанак сенесценције (Blagosklonny и сар., 2018; Saoudaoui и сар., 2021), постоје и истраживања која показују да је mTOR инхибиција значајна у регулацији SASP (енг. *Senescence associated secretory phenotype*) као и у стимулацији остеогенезе и адипогенезе (Laberge и сар., 2015; Xiang и сар., 2011); додатна истраживања су неопходна да би се утврдио значај овог ефекта. Истраживања спроведена у оквиру ове студије су показала да хидроксиуреом индуковане мезенхималне стромалне ћелије показују смањену способност остеогене и адипогене диференцијације а да се притом експресија мезенхималних површинских маркера не мења. Са друге стране третман није имао утицаја на ERK1/2 сигнални пут, а довео је до смањене активације p38, AK1 и STAT3. Регулација ових сигналних путева значајна је за ћелијску пролиферацију као и за диференцијацију мезенхималних стромалних ћелија (Rodríguez-Carballo и сар., 2016; Sanpaolo и сар., 2020).

Ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних ћелија на туморске HEL ћелије посматран је гајењем ових ћелија у кокултури. Резултати су демонстрирали да претходно третиране мезенхималне стромалне ћелије инхибирају пролиферацију HEL ћелија. Додатни експерименти, према којима су котретмани инхибиторима ROS и TGF- β 1 успели да пониште негативан ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију HEL, указују на значај улоге оксидативног стреса и продукције TGF- β 1 у инхибицији пролиферације HEL. Додатно, испитан је ефекат ROS и TGF- β 1 на инхибицију пролиферације туморских ћелија у експерименту у којем су мезенхималне стромалне ћелије котретиране хидроксиуреом и инхибиторима ROS и TGF- β 1. Овим котретманима поништен је инхибиторни ефекат сенесцентних ћелија на пролиферацију HEL што указује на значај улоге оксидативног стреса и TGF- β 1 у овом процесу. Такође, хидроксиуреом индуковане сенесцентне ћелије су показале повећану генску експресију и продукцију TGF- β 1. Према подацима из литературе велики број лекова који инхибирају туморски раст овај ефекат испољавају путем повећане продукције ROS

(Sawal и сар., 2017; Laurent и сар., 2005). Познато је и да активација TGF- β 1/SMAD3 сигналног пута у мијелоидним леукемијским ћелијама води ка застоју ћелијског циклуса и заустављању пролиферације (Tu и сар., 2014; Chen и сар., 2017). Хидроксиуреом третиране мезенхималне стромалне ћелије нису имале утицај на пролиферацију K562 ћелија, што је објашњено одсуством рецептора 2 за TGF- β 1 на K562 ћелијама, наспрот HEL ћелија које имају експримиран овај рецептор, те показују већу сензитивност на TGF- β 1 (Wu и сар., 2017; Marone и сар., 2002). Овај резултат је потврђен и експериментима у оквиру ове дисертације.

Познато својство мезенхималних стромалних ћелија које се увелико експлоатише у ћелијској терапији је њихова имуносупресивна способност (Jin и сар., 2015; Najar и сар., 2016). Да би се испитао ефекат хидроксиуреа на имуномодулаторне карактеристике мезенхималних стромалних ћелија, третиране ћелије су гајене са CD3/CD28 стимулираним Т лимфоцитима па је анализирана њихова пролиферација. Према резултатима ове студије, хидроксиуреом третиране мезенхималне стромалне ћелије имају већи капацитет инхибиције Т лимфоцита у поређењу са нетретираним ћелијама. Према раније објављеним студијама један од SASP фактора који доприноси овом ефекту је TGF- β 1 (Thomas и сар., 2005; Oh и сар., 2013), чија повећана експресија је идентификована и у оквиру ове студије након третмана мезенхималних стромалних ћелија хидроксиуреом, али су потребна додатна истраживања да би се потврдио овај ефекат. Показано је и да хидроксиуреом третиране мезенхималне стромалне ћелије не повећавају индукцију мијелоидних супресорних ћелија у поређењу са нетретираним ћелијама. Улога мезенхималних стромалних ћелија у подржавању мијелоидних супресорних ћелија зависи од бројних фактора укључујући и инфламацију (Xu и сар., 2015).

Досадашње студије су показале да сенесцентне ћелије могу допринети развоју фибротичних болести путем продукције TGF- β 1 у оквиру SASP (Acosta и сар., 2013), а са друге стране индукција сенесценције миофибробласта може допринети и смањењу фиброзе (Meng и сар., 2020). Хидроксиуреом индуковане сенесцентне мезенхималне стромалне ћелије су показале смањену сензитивност на TGF- β 1 посредовану

трансформацију MCT у α SMA позитивне миофибробласте као и смањену активацију и фосфорилацију SMAD3. Овај резултат је објашњен смањењем експресије TGF- β 1 рецептора на мезенхималним стромалним ћелијама након третмана хидроксиуреом.

Д) Објављени радови који чине део докторске дисертације

1. **Bjelica S**, Diklić M, Đikić D, Kovačić M, Subotički T, Mitrović-Ajtić O, Radojković M, Čokić VP, Santibanez JF. Hydroxyurea-induced senescent peripheral blood mesenchymal stromal cells inhibit bystander cell proliferation of JAK2V617F-positive human erythroleukemia cells. The FEBS journal. 2019 Sep;286(18):3647-63. (IF 5.542; M21)
2. **Kapor S**, Vukotić M, Subotički T, Đikić D, Mitrović Ajtić O, Radojković M, Čokić VP, Santibanez JF. Hydroxyurea Induces Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Senescence and Modifies Cell Functionality In Vitro. Journal of Personalized Medicine. 2021 Nov;11(11):1048. (IF 4.945; M21)
3. **Kapor S**, Čokić V, Santibanez JF. Mechanisms of Hydroxyurea-Induced Cellular Senescence: An Oxidative Stress Connection? Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2021 Oct 18;2021. (IF 6.543; M21)

Ђ) Закључак (образложење научног доприноса)

Докторска дисертација „Испитивање модулације сенесценције индуковане хидроксиуреом на модел систему хуманих мезенхималних стромалних ћелија“ др Сунчице Бјелице представља оригинални научни допринос у расветљавању утицаја терапије хидроксиуреом на мезенхималне матичне ћелије и последични утицај ових терапијом измењених ћелија на њихову околину. Поред увида у детаљни механизам деловања ХУ на мезенхималне стромалне ћелије, првенствено на индукцију сенесценције, што је резултат који се по први пут описује у овој дисертацији, ова истраживања упућују и на потенцијалну примену ових ћелија у терапији хематолошких малигнитета, аутоимуних и профибротичних стања. Докторска дисертација је урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви су били прецизно дефинисани, научни приступ је био оригиналан и пажљиво изабран, а методологија рада је била савремена. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију др Сунчице Бјелице и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 01.02.2022.године

Чланови Комисије:

Проф.др Марија Пљеша-Ерцеговац

Проф.др Милош Марковић

Проф.др Владимир Јуришић

Ментор:

Проф.др Милица Радојковић

Коментор:

Хуан Ф. Сантибањез, научни саветник