

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.11.2019. године, на основу молбе ментора, др Милице Јовановић Кривокуће, вишег научног сарадника Института за примену нуклеарне енергије Универзитета у Београду и др Маје Чакић-Милошевић, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Александре А. Вилотић**, истраживача-сарадника Института за примену нуклеарне енергије Универзитета у Београду, под насловом: „**Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека**”, у саставу:

1. др Милица Јовановић Кривокућа, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за примену нуклеарне енергије
2. др Маја Чакић-Милошевић, доцент, Универзитет у Београду - Биолошки факултет
3. др Љиљана Вићовац Панић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за примену нуклеарне енергије
4. др Биљана Божић Недељковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет
5. проф др Светлана Врзић Петронијевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Медицински 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

Докторска дисертација **Александре А. Вилотић** под насловом „**Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека**”, обухвата укупно 119 страна. Нумерисани део докторске дисертације садржи 101 страну и подељен је на **седам поглавља**: **Увод** (26 страна), **Циљ истраживања** (једна страна), **Материјал и методе** (16 страна), **Резултати** (19 страна), **Дискусија** (девет страна), **Закључци** (две стране), **Литература** (21 страна). Дисертација садржи 4 табеле (у поглављу Увод) и 32 слике (11 слика у поглављу Увод, једна слика у поглављу Материјал и методе, 20 слика у поглављу Резултати). Поглавље **Литература** садржи 212 библиографских јединица.

Ненумерисани део докторске дисертације обухвата насловну страну на српском и енглеском језику, страну са информацијама о менторима и члановима Комисије, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница и садржај који се налазе на почетку дисертације, док се на крају дисертације налазе биографија аутора, изјава о ауторству, изјава о истоветности електронске и штампане верзије докторског рада као и изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације Александре А. Вилотић је испитивање значаја фактора инхибиције миграције макрофага (енг. *macrophage migration inhibitory factor* - MIF) за функцију трофобласта човека. Испитиван је утицај MIF на функционална својства ендоваскуларног трофобласта, улога MIF у цитокинском одговору трофобласта на инфекцију као и диференцијална експресија и секреција MIF у ћелијама нормалног трофобласта и хориокарциномским ћелијама.

Поглавље **Увод** је подељено на осам потпоглавља. У првом потпоглављу су представљени основна грађа и функција плаценте човека са посебним освртом на трофобласт, специјализоване ћелије плаценте које имају кључну улогу у развоју и функцији овог органа. У другом потпоглављу дат је преглед фаза развоја плаценте човека до краја првог триместра трудноће. Најпре су описани први стадијуми развоја ембриона и процеси који се одвијају у зиду материце мајке припремајући ендометријум за имплантацију. У наставку, детаљно је описан процес имплантације ембриона који представља почетак развоја плаценте као и развој хорионских ресица, основних јединица грађе и функције овог органа. У наредним потпоглављима представљене су потпопулације екстравилусног трофобласта (ЕВТ), њихове основне карактеристике, функционална својства и процеси у којима учествују. Детаљније је описан процес диференцијације ЕВТ ћелија ка инвазивном фенотипу као и процес ремоделовања спиралних артерија у коме ћелије ендоваскуларног ЕВТ имају значајну улогу. Затим је дат преглед молекула који имају значајну улогу у процесу инвазије трофобласта.

У наставку поглавља, представљен је значај проинфламаторног окружења на месту имплантације као и значај интеракције ћелија имунског система мајке и трофобласта за имплантацију, инвазију трофобласта и даљи развој плаценте. Поред тога, истакнуто је да интраутерина инфекција у току трудноће представља значајан фактор који доприноси развоју патологија у трудноћи. У посебном одељку, представљене су основне карактеристике хориокарцинома, малигног типа гестационих трофобластних болести. У последњем потпоглављу представљене су основне карактеристике MIF, описани су MIF ген и протеин као и експресија и секреција овог цитокина. Такође, приказани су рецептори

за MIF и биолошка функција овог цитокина са детаљније описаном улогом MIF у канцерогенези. У последњем делу овог потпоглавља описана је експресија MIF у репродуктивном систему жене и досадашња сазнања о улози MIF у трудноћи, значају овог цитокина за функцију трофобласта и плаценте.

У поглављу **Циљ истраживања** наведена су три непосредна циља:

1. Испитивање значаја ендогеног MIF за функционална својства трофобласта човека *in vitro*. У оквиру овог циља истраживања постављени су специфични циљеви који се односе на испитивање утицаја ендогеног MIF на инвазију трофобласта, експресију протеина значајних за процес трофобластне инвазије, диференцијацију трофобласта ка ендоваскуларном фенотипу и функционална својства ендоваскуларног трофобласта.
2. Испитивање експресије MIF у одговору трофобласта на инфекцију
3. Испитивање диференцијалне експресије и секреције MIF у ћелијским линијама нормалног и малигно трансформисаног трофобласта.

У поглављу **Материјал и методе** наведене су ћелијске линије коришћене у истраживањима, детаљно су описане примењене експерименталне процедуре и технике као и начин обраде резултата.

У истраживањима су коришћене следеће ћелијске линије: ћелијска линија нормалног екстравилусног трофобласта првог триместра HTR-8/SVneo, хориокарциномске ћелијске линије JAg и Jeg-3 и примарне ендотелне ћелије изоловане из вене пупчаника човека (енг. *human umbilical vein endothelial cells* - HUVEC). Описани су услови одржавања у култури и експериментални третмани трофобластних линија као и методе изолације, култивације и карактеризације HUVEC ћелија. За испитивање улоге ендогеног MIF у функционалним својствима трофобласта утишавана је експресија MIF гена у HTR-8/SVneo ћелијама помоћу малих интерферирајућих РНК (енг. *small interfering RNA* - siRNA). Функционална својства HTR-8/SVneo ћелија након гашења експресије MIF гена испитивана су функционалним *in vitro* тестовима: тестом ћелијске инвазије, тестом формирања тубула и методом ко-културе екстравилусних трофобластних HTR-8/SVneo и ендотелних HUVEC ћелија. За одређивање броја вијабилних ћелија коришћен је МТТ тест док је *Crystal violet* тестом одређиван број адхерентних ћелија. Експресија гена на нивоу иРНК одређивана је qPCR методом. Експресија протеина анализирана је имунофлуоресцентним бојењем ћелија, проточном цитофлуориметријом као и *Western blot* методом након електрофоретског раздвајања протеина на полиакриламидном гелу у нативним или денатуришућим и редукујућим условима. Ниво матриксних металопроотеиназа (ММП)-2 и ММП-9 одређиван је желатинском зимографијом. Добијени резултати су обрађени и графички приказани помоћу *GraphPad Prism Demo Software* (GraphPad Software, Inc., SAD).

У поглављу **Резултати** експериментално добијени подаци, подељени у три потпоглавља према постављеним циљевима, систематично су и јасно представљени у виду графика, имуноблотова и микрографија на 20 слика које прати текстуално објашњење.

У првом потпоглављу представљено је успешно гашење експресије *MIF* гена на нивоу иРНК и протеина. Затим, показано је да је утишавање експресије *MIF* гена довело до смањења инвазивности HTR-8/SVneo ћелија као и до смањења експресије ММП-2, ММП-9 и интегринске субјединице α_1 , значајних посредника трофобластне инвазије. Такође, HTR-8/SVneo ћелије су формирале значајно краће и мање разгранате тубуле након гашења експресије *MIF* гена у поређењу са контролном групом ћелија што указује на смањену способност диференцијације ка ендоваскуларном фенотипу. Помоћу методе ко-културе трофобластних HTR-8/SVneo и монослоја ендотелних HUVEC ћелија показано је да је гашење експресије *MIF* гена довело до смањења способности интеграције HTR-8/SVneo ћелија у ендотелни монослој. Затим, показано је да кондиционирани медијуми HTR-8/SVneo ћелија након утишавања експресије *MIF* гена нису утицали на вијабилност и број адхерентних HUVEC ћелија. Међутим, утишавање експресије *MIF* гена у HTR-8/SVneo ћелијама доводило је до смањења експресије N-кадхерина, значајног посредника у интеракцији трофобластних и ендотелних ћелија.

У другом потпоглављу, испитивана је експресија проинфламаторних цитокина интерлеукина(IL)-6, IL-8 и MIF након третмана HTR-8/SVneo ћелија липополисахаридом. Најпре је утврђено да липополисахарид у испитиваним концентрацијама није утицао на вијабилност и број адхерентних HTR-8/SVneo ћелија, а затим је показано да је у примењеним концентрацијама повећао експресију гена за IL-6 и IL-8, ниво *MIF* иРНК у HTR-8/SVneo ћелијама, као и ниво MIF протеина у кондиционираним медијумима ових ћелија у односу на контролне ћелије.

У трећем потпоглављу приказани су резултати испитивања експресије MIF, рецептора за MIF и молекулских комплекса које формира MIF у HTR-8/SVneo ћелијама нормалног трофобласта и хориокарциномским JAr и Jeg-3 ћелијама као и резултати испитивања нивоа MIF у кондиционираним медијумима наведених ћелијских линија. Показано је да се ниво експресије *MIF* иРНК и MIF протеина не разликује између испитиваних ћелијских линија. MIF је био највише заступљен у цитоплазматској фракцији али се могао детектовати и у мембранској, нуклеарној солубилној и нуклеарној хроматинској фракцији свих испитиваних ћелија. Међутим, експресија гена за рецепторе за MIF на нивоу иРНК била је значајно виша код хориокарциномских у односу на HTR-8/SVneo ћелије (*CD74* иРНК у JAr и Jeg-3 ћелијама; *CXCR2* иРНК у Jeg-3 ћелијама). Такође, ниво MIF у кондиционираним медијумима JAr ћелија био је значајно нижи у односу на ниво овог протеина у кондиционираним медијумима ћелија друге две испитиване ћелијске линије. Показано је да се ниво секретованог MIF од стране JAr ћелија повећавао након третмана Фулвестрантом, инхибитором естрогенских рецептора. Испитивање молекулских комплекса које образује MIF у нативним условима показало је

да се MIF налази углавном у комплексима молекулске масе веће од 150 kDa у ћелијским лизатима свих испитиваних ћелијских линија, а да је само у случају Jeg-3 ћелија био стално присутан протеински комплекс молекулске масе око 145 kDa. Овај протеински комплекс је само ретко и у много мањем интензитету детектован у лизатима HTR-8/SVneo и JA_g ћелија. Такође, у кондиционираним медијумима ћелија свих испитиваних ћелијских линија, MIF је детектован у комплексима молекулске масе веће од 150 kDa. Специфичан протеински комплекс молекулске масе око 145 kDa јављао се у кондиционираним медијумима Jeg-3 ћелија.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су на критички начин анализирани и повезани са ранијим истраживањима групе у оквиру које је кандидаткиња урадила експериментални део докторске дисертације и тумачени у контексту досадашњих података из литературе који су у вези са предметом истраживања којим се кандидаткиња бави у својој дисертацији. У првом делу овог поглавља анализирани су резултати испитивања утицаја ендогеног трофобластног MIF на функционална својства трофобластних HTR-8/SVneo ћелија. Истакнуто је да ендогени MIF учествује у регулацији процеса трофобластне инвазије путем регулације експресије важних медијатора овог процеса – MMP-2, MMP-9, интегринске субјединице α_1 и N-кадхерина. Такође, истакнут је значај MIF за диференцијацију трофобласта ка ендоваскуларном фенотипу као и за регулацију интеракције ендоваскуларног трофобласта и ендотела која се *in vivo* одвија током ремоделовања спиралних артерија. Добијени резултати указују на то да ендогени MIF нема утицаја на трофобластне секреторне факторе који би доводили до апоптозе ћелија ендотела. Смањење експресије N-кадхерина, као последица утишавања *MIF* гена, указује на могући механизам којим MIF регулише интеграцију трофобласта у ендотел, с обзиром на то да је овај кадхерин значајан посредник у интеракцији ова два типа ћелија.

У другом делу овог поглавља анализирана је улога MIF у цитокинском одговору трофобласта на инфекцију. Трофобласт би путем повећања продукције проинфламаторних цитокина, у одговору на присуство инфективног агенса, могао учествовати у регулацији имунског одговора. Са друге стране, прекомерно присуство MIF могло би допринети поремећају функције трофобластних ћелија услед инфекције. Подаци добијени у истраживањима представљеним у овој докторској дисертацији доприносе дотатном расветљавању још увек недовољно објашњених механизма који доводе у везу интраутерину инфекцију у току трудноће и развој патологија у трудноћи.

У трећем делу овог поглавља у контексту података из литературе о улози MIF у настанку различитих типова канцера, анализирани су добијени подаци о експресији и секрецији MIF, експресији рецептора за MIF и молекулским комплексима које формира MIF у нативним условима у HTR-8/SVneo ћелијама нормалног трофобласта и хориокарциномским JA_g и Jeg-3 ћелија. Утврђена повећана експресија гена за рецепторе за MIF у хориокарциномским ћелијама у односу на ћелије нормалног трофобласта, у складу

је са резултатима испитивања на другим типовима канцера и може указивати на повећану реактивност хориокарциномских ћелија на присуство MIF. Затим, употребом Фулвестранта показано је да је значајно нижи ниво секретованог MIF од стране JAg ћелија последица, барем делом, инхибиторне аутокрине активности естрадиола. Детектоване разлике у молекулским комплексима које MIF формира у хориокарциномским JAg и Jeg-3 ћелијама указују на различите специфичне молекулске партнере MIF у овим ћелијским линијама што би потенцијално могло бити у основи различитог метастатског потенцијала ове две хориокарциномске линије.

У поглављу **Закључци** систематично су сумирани резултати на основу којих су изведени закључци у складу са постављеним циљевима ове докторске дисертације.

Поглавље **Литература** садржи 212 библиографских јединица. Наведени литературни извори су од значаја за области којима се бави ова докторска дисертација, правилно су и на одговоарајућим местима цитирани у дисертацији.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Jovanović-Krivokuća M, Stefanoska I, Abu Rabi T, **Vilotić A**, Petronijević M, Vrzić-Petronijević S, Radojčić Lj, Vićovac Lj. MIF is among the proinflammatory cytokines increased by LPS in the human trophoblast line. Arch Biol Sci. 2016 Jan 25;68(4):715-722. **(M23)**

<https://doi.org/10.2298/ABS151123012J>

Линк ка публикацији: <http://www.serbiosoc.org.rs/arch/index.php/abs/article/view/1242>

2. Vilotić A, Jovanović Krivokuća M, Stefanoska I, Vrzić Petronijević S, Petronijević M Vićovac L. MIF is involved in endovascular trophoblast cell function *in vitro*. EXCLI J. 2019; 18:1007-1018. **(M21)**

<https://doi.org/10.17179/excli2019-1630>

Линк ка публикацији: <https://www.excli.de/index.php/excli/article/view/1333>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Vilotić A**, Jovanović Krivokuća M, Stefanoska I, Vrzić Petronijević S, Petronijević M, Vićovac L. HTR-8/SVneo cells require MIF for endothelium replacement *in vitro*. CTR Annual Conference, 08-09.07.2018., Cambridge, UK. **(M34)**
2. **Vilotić A**, Jovanović Krivokuća M, Vićovac L. Silencing of MIF Affects Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Expression in Human Trophoblast HTR-8/SVneo Cell Line. FEBS3+ conference “From FEBS3+ conference molecules to living systems”, 02-05.09. 2018., Siófok, Hungary. Programme and Book of Abstracts p143. **(M34)**
3. **Vilotić A**, Jovanović Krivokuća M, Bojić-Trbojević Ž, Vićovac Lj. Different forms of MIF are expressed and secreted by choriocarcinoma and normal trophoblast cells, 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia, 20-22.09.2017., Belgrade, Serbia. Book of Abstracts p86. **(M34)**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Александре А. Вилотић, Б3048/2015**, подвргнута је софтверској провери оригиналности 15.10.2019. год. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили дана 16.10.2019. год.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 26%. Међутим, назначени делови текста се односе на лична имена, опште појмове и нашироко коришћене синтагме, називе ћелијских линија, називе реагенаса, скраћенице, коришћење стандардних израза из области истраживања, као и коришћења кратких фраза уобичајених у датој области. Наведена преклапања краћих делова појединих различитих реченица нису повезана и не чине смислену целину. Подударности са наведеним изворима у највећем броју случајева износе мање од 1%.

С обзиром на наведено, а у складу са чланом 9 Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Александре А. Вилотић**, под насловом „**Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека**”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Александре А. Вилотић**, под насловом „**Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека**”, представља оригинални рад који даје значајан научни допринос у области биологије репродукције и истраживања функције трофобласта. Дисертација је урађена у складу са принципима научно-истраживачког рада и садржи све потребне елементе релевантне за овакав тип рада. Јасно дефинисани циљеви докторске дисертације су, применом адекватно одабраних метода истраживања, успешно реализовани. Добијени резултати проширују сазнања о специфичној улози ендогеног трофобластног MIF у инвазији трофобласта и ремоделовању спиралних артерија, процесима од кључног значаја за развој и правилно функционисање плаценте. Такође, ова дисертација указује на потенцијалну улогу MIF у патолошким процесима у трудноћи као што су одбрана од инфекције и трофобластни малигнитети доприносећи бољем разумевању етиологије ових стања. Резултати истраживања који су представљени у овој дисертацији објављени су у међународним часописима у оквиру два оригинална научна рада.

Имајући у виду све наведено, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Александри А. Вилотић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека**”.

У Београду, 15.11.2019. године

КОМИСИЈА:

др Милица Јовановић Кривокућа, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за примену нуклеарне енергије

др Маја Чакић-Милошевић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Љиљана Вићовац Панић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за примену нуклеарне енергије

др Биљана Божић Недељковић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

проф др Светлана Врзић Петронијевић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Медицински факултет