

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

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 19. јуна 2020. године, на основу молбе ментора, проф. др Александре Кораћ, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Иване Дрвеница, научног сарадника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Ане З. Станчић, истраживача-сарадника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом: „Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*”, у саставу:

1. проф. др Александра Кораћ, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет
2. др Ивана Дрвеница, научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања
3. др Весна Илић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

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 Ане З. Станчић под насловом „Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*”, је написана на укупно 204 стране. Нумерисани (пагинирани) текст докторске дисертације садржи 188 страна и подељен је у **седам поглавља**: **Увод** (40 страна), **Циљеви** (4 стране), **Материјал и методи** (28 страна), **Резултати** (41 страна), **Дискусија** (21 страна), **Закључци** (4 стране), **Литература** (32 страна), **Прилози** (18 страна). Дисертација садржи 4 табеле (2 табеле у поглављу Материјал и методи и 2 табеле у поглављу Резултати) и 47 слика (16 слика у поглављу Увод, 4 слике у поглављу Материјал и методи, 27 слика у поглављу Резултати). Поглавље **Литература** садржи 467 библиографских јединица. Ненумерисани део на почетку докторске дисертације обухвата насловну страну на српском и енглеском језику, страну са информацијама о менторима и члановима Комисије, страну са информацијама о пројектима у оквиру којих је урађена докторска дисертација, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику, и садржај. Ненумерисани део на крају дисертације

обухвата биографију аутора, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада као и изјаву о коришћењу.

### **Анализа докторске дисертације**

Хемоглобин је висококонзервисани металопротеин који се због своје основне биолошке функције, реверзибилног везивања кисеоника, налази у основи аеробног начина живота на планети Земљи. Такође, овај протеин има важну улогу у ћелијској сигнализацији и модулацији инфламаторног одговора. Највећи број својих функција хемоглобин остварује док се налази унутар еритроцита. Међутим, услед интраваскуларне хемолизе, која настаје због оштећења мембране еритроцита физичком траумом, микроорганизмима или молекулима секретованим у различитим патолошким стањима, хемоглобин бива отпуштен у циркулацију или прелази у ткива где улази у састав инфламаторне микросредине. Данас је познато да је ванћелијски хемоглобин од значаја за етиологију и патофизиологију бројних болести, попут пароксизмалне ноћне хемоглобинурије, анемије српастих еритроцита, Алцхајмерове болести, мултипле склерозе, церебралне интравентрикуларне хеморагије и прееклампсије.

Мезенхимске матичне ћелије (ММЋ) се интензивно изучавају последњих неколико деценија због свог регенеративног и имуномодулаторног потенцијала. Ове ћелије имају способност миграције на место инфламације, где је њихова биолошка функција одређена локално присутним ћелијама и молекулима. Иако су ванћелијски хемоглобин и његови деградациони производи битна компонента инфламаторне микросредине, утицај хемоглобина на ММЋ је до сада веома мало изучаван. Оскудни подаци су добијени пре свега на хемоглобинима бескичмењака, који се по структури веома разликују од хемоглобина кичмењака. У својој докторској дисертацији Ана З. Станчић је испитивала утицај ванћелијског хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија, при чему су као молекулски модели коришћени лако доступни свињски и говеђи хемоглобини који имају велики степен хомологије са хуманим хемоглобином, али и хемоглобинима свих осталих сисара. За рад на овој дисертацији одабрани су и одговарајући ћелијски модели са којима ванћелијски хемоглобин може доћи у контакт при интраваскуларној хемолизи: моноклеарне (МНЋ) и полиморфонуклеарне ћелије (ПМЋ) периферне крви, и мезенхимске матичне ћелије периферне крви (ПК-ММЋ) човека. Додатно, утицај ванћелијског хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија испитан је и на четири мезенхимске ћелијске линије миша које представљају униформније модел системе у односу на примарне ћелије: АТДС5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12 и уједно су *in vitro* модели за проучавање хондрогенезе, остегенезе, адипогенезе и миогенезе.

Поглавље **Увод** подељено је на два главна потпоглавља. У првом потпоглављу дат је кратак преглед распрострањености молекула хемоглобина у различитим царствима живих организама и описани су значај и историјат проучавања хемоглобина. У наставку је описана структура молекула хемоглобина на примеру хемоглобина сисара, јер је хемоглобин коришћен у изради ове дисертације изолован из две сисарске

врсте (свиње и говеда). Како молекула хемоглобина садржи три структурне компоненте: глобинске ланце, хем групу и гвожђе, у наставку ове докторске дисертације објашњени су процеси експресије глобинских гена, структура хема и метаболизам гвожђа. Такође, у оквиру овог потпоглавља дат је преглед биолошких функција хемоглобина: улога у преносу гасова (кисеоника, угљен-диоксида, азот-оксида, угљен-моноксида), улога у ванћелијској средини са прегледом предложених механизма дејства, као и улога у имунском одговору и у различитим болестима и патолошким стањима. У посебном одељку описана је употреба хемоглобина у биотехнолошким истраживањима, при чему је највећа пажња усмерена на преносиоце кисеоника на бази хемоглобина, као и специфичности примене хемоглобина бескичмењака и хемоглобина из кланичне крви у биотехнологији.

У другом потпоглављу, описани су ћелијски модели за испитивање ефеката ванћелијског хемоглобина. У посебној целини описане су две категорије адултних матичних ћелија: хематопоеетске и мезенхимске. Посебан пажња је усмерена на мезенхимске матичне ћелије, за које су описани биолошки извори (ткива из којих су изоловане) и функцијске карактеристике: способност миграције, диференцијација ка одређеним типовима ћелија и имуномодулација. У посебном одељку описани су леукоцити периферне крви, МНЋ и ПМЋ, као и њихове функцијске карактеристике од значаја и за неспецифичан и за адаптивни имунски одговор.

У поглављу **Циљеви** наведена су три непосредна циља:

#### **Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина**

У оквиру овог циља истраживања постављени су специфични циљеви који се односе на изолацију хемоглобина градуалном хипотоничном хемолизом; испитивање садржаја протеина у узорцима хемоглобина електрофоретским техникама; испитивање садржаја липида у узорцима хемоглобина хроматографским техникама; анализу величине колоидних честица у узорцима хемоглобина фотон корелационом спектроскопијом; анализу UV-Vis апсорпционих спектра хемоглобина и одређивање способности хемоглобина да редукује радикал-катјон 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине (ABTS радикал).

#### **Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина и потврда њихове биолошке активности**

У оквиру овог циља истраживања постављени су специфични циљеви који се односе на испитивање: садржаја хемоглобина у ћелијским културама МНЋ и ПК-ММЋ; цитотоксичности хемоглобина на моделу МНЋ; утицаја хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека; утицаја хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви човека и утицаја хемоглобина на продукцију реактивних врста кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS) у леукоцитима периферне крви човека.

## Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија

У оквиру овог циља истраживања постављени су специфични циљеви који се односе на испитивање утицаја хемоглобина на вијабилност и миграторни потенцијал ПК-ММЋ и мишијих мезенхимских ћелијских линија АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12, као и на ћелијски циклус, апоптозу и клоногени потенцијал ПК-ММЋ. Додатно, испитан је утицај хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија хистохемијским техникама уз праћење генске експресије специфичних маркера хондрогене диференцијације ПК-ММЋ и АТDC5 ћелија уз анализу експресије гена за SOX9, колаген тип I, II и XI; остеогене диференцијације ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија уз анализу експресије гена за RUNX2, алкалну фосфатазу (енг. *alkaline phosphatase*, ALP), остеокалцин и колаген тип I; адипогене диференцијације ПК-ММЋ и 3Т3-Л1 ћелија уз анализу експресије гена за рецептор  $\gamma$  који се активира уз пролиферацију пероксизома (енг. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* , PPAR- $\gamma$ ), адипонектин и липопротеин липазу; миогене диференцијације ПК-ММЋ и С2С12 ћелија уз анализу експресије гена за миогенин и мишићну креатин киназу (енг. *muscle creatine kinase*, МСК). Праћен је и утицај хемоглобина на имуномодулаторни потенцијал ПК-ММЋ праћењем ефекта на: генску експресију специфичних имуномодулаторних гена ММЋ: *HLA-A*, *HLA-G*, *HLA-DRA*, *TGFB1*, *IDO1*, *PTGS2*, *IL6*, *HMOX1*; модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу ММЋ и модулаторни ефекат ПК-ММЋ на пролиферацију ММЋ.

Поглавље **Материјал и методи** садржи шест потпоглавља. У првом потпоглављу побројани су комерцијални реагенси коришћени у изради ове докторске дисертације. Даље, описани су медијуми и пуфери коришћени за култивацију ћелија и анализу ћелијских функција, док су хемоглобин, примарне ћелије и ћелијске линије коришћени у изради ове докторске дисертације описани у трећем потпоглављу. Експериментални дизајн постављен у складу са наведеним циљевима истраживања дат је у четвртном потпоглављу. У петом потпоглављу, у оквиру три целине, описани су коришћени методи: методи за изолацију и карактеризацију хемоглобина, методи за анализу ћелијских функција и методи за анализу експресије гена. У оквиру метода за изолацију и карактеризацију хемоглобина описани су методи за: добијање суспензије пакованих еритроцита; изолацију хемоглобина градуалном хемоллизом и делимично пречишћавање хемоглобина тангенцијалном ултрафилтрацијом; одређивање протеинског садржаја у узорцима хемоглобина електрофорезом у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата (енг. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) у редукујућим условима и изоелектричним фокусирањем; одређивање садржаја липида у узорцима хемоглобина хроматографијом на танком слоју силика гела и анализом масних киселина гасно-течном хроматографијом; одређивање просечне величине молекула присутних у узорцима хемоглобина фотон корелационом спектроскопијом; одређивање UV-Vis апсорпционих спектра узорака хемоглобина; анализу способности редукције ABTS радикала и

анализу садржаја хемоглобина у ћелијским културама. У оквиру метода за анализу ћелијских функција описани су методи за: испитивање утицаја хемоглобина на вијабилност ћелија МТТ тестом, применом Ноеchst ДНК обележивача и бојењем ћелија трипан плавим; испитивање функцијских карактеристика леукоцита периферне крви човека тестом адхезије леукоцита за полистирен, NBT тестом и CFC (енг. *colony forming cells*) тестом; испитивање функцијских карактеристика мезенхимских ћелија анализом ћелијског циклуса и клоногеног потенцијала ПК-ММЋ, покретљивости мезенхимских ћелија „Scratch“ тестом, диференцијационог потенцијала мезенхимских ћелија ка хондрогеној, остеогеној, адипогеној и миогеној линији и имуномодулаторног потенцијала испитивањем модулаторног ефеката ПК-ММЋ на ћелијски циклус, апоптозу и пролиферацију алогених МНЋ и експресију имуномодулаторних гена ПК-ММЋ. У оквиру метода за анализу експресије гена описани су методи за: изолацију укупне РНК, реверзну транскрипцију, ланчану реакцију полимеразе (енг. *polymerase chain reaction*, PCR), визуелизацију PCR производа електрофорезом у агарозном гелу и дате су две табеле са коришћеним прајмерима за PCR. У последњем потпоглављу описане су статистичке анализе коришћене за обраду података добијених применом квантитативних метода.

У поглављу **Резултати** подељеном на три потпоглавља према постављеним циљевима, систематично су и јасно представљени експериментално добијени подаци кроз 27 мултипанелских слика, које садрже графике, микрографије и табеле, и које прати текстуално објашњење.

У првом потпоглављу приказани су резултати који су показали да свињски и говеђи хемоглобини изоловани из кланичне крви коришћени за израду ове докторске дисертације имају одлике нативног хемоглобина. Конкретно, показано је да се концентрација свињског и говеђег хемоглобина у пречишћеним изолатима кретала у распону од 30 до 70 g/L, а садржај метхемоглобина није прелазио 2%. Такође, SDS-PAGE показао је да и у свињским и у говеђим изолатима више од 90% протеина чине протеини који по молекулској маси од 16 kDa одговарају глобинским ланцима. Након хроматографског раздвајања у изолатима обе животињске врсте детектовани су само фосфолипиди, а у оквиру њих детектовано је 10 масних киселина у изолатима свињског хемоглобина, и 6 масних киселина у изолатима говеђег хемоглобина. Фотон корелационом спектроскопијом показано је да је просечан хидродинамички пречник колоидних честица у изолатима свињског и говеђег хемоглобина износио 7 nm, што одговара хидродинамичком пречнику нативног молекула хемоглобина. У апсорпционим спектрима изолата свињског и говеђег хемоглобина идентификовани су сви апсорпциони максимуми карактеристични за нативни оксихемоглобин: 275, 350, 413-415, 541 и 576 nm, уз очуваност оксидационог стања гвожђа као Fe<sup>2+</sup>. С обзиром да је показано да је хемоглобин у свим анализираним изолатима представљао доминантан протеин, и да су фосфолипиди, који потичу од мембрана еритроцита као главни контаминанти изолата били присутни у ниским концентрацијама, у наредним деловима текста ове дисертације термин „изолат“ замењен је термином „хемоглобин“.

У другом потпоглављу, представљени су резултати испитивања биолошке активности свињског и говеђег хемоглобина. Показано је да је концентрација свињског и говеђег хемоглобина у култури нестимулисаних МНЋ опадала на дозно зависан начин и да стимулација митогеном фитохемаглутинаином (енг. *phytohaemagglutinine*, РНА) није додатно утицала на снижење садржаја хемоглобина у културама МНЋ након 48 h. У културама ПК-ММЋ, дозно зависна потрошња свињског и говеђег хемоглобина била је повећана након 96 h за 20% у односу на 48 h. Резултати МТТ теста су показали да је свињски хемоглобин значајно смањивао вијабилност нестимулисаних МНЋ након 5 дана у концентрацијама вишим од 4  $\mu\text{M}$ , док је овај ефекат говеђи хемоглобин показао у концентрацијама вишим од 1  $\mu\text{M}$ . У културама РНА стимулисаних МНЋ и свињски и говеђи хемоглобин су значајно, на дозно зависан начин, смањивали вијабилности ових ћелија у свим испитиваним концентрацијама (0,25-16  $\mu\text{M}$ ). Додатно, резултати испитивања утицаја хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију опредељених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека, показали су да ефекат хемоглобина на ову категорију матичних ћелија постоји, али да постоје и велике интериндивидуалне варијације у укупном броју колонија опредељених ћелија хематопозе гајених у присуству хемоглобина. Независно од ефекта који је испољио на број колонија, хемоглобин је показао снажан униформан утицај на морфологију колонија: колоније формиране у присуству хемоглобина биле су крупније од оних формираних у стандардном медијуму за ћелијску културу. Свињски хемоглобин доводио је до смањења адхезивности МНЋ у тесту без пре-адхезије у концентрацији од 1  $\mu\text{M}$ , а исти ефекат остварио је и на ПМЋ у свим испитиваним концентрацијама. За разлику од свињског, говеђи хемоглобин није остварио ефекат на адхезивност МНЋ и ПМЋ у тесту без пре-адхезије. Свињски хемоглобин није остварио ефекат на адхезивност МНЋ и ПМЋ у тесту са пре-адхезијом, док је говеђи хемоглобин у овом тесту доводио до стимулације адхезивности МНЋ у све три испитиване концентрације (0,1, 1 и 10  $\mu\text{M}$ ) и стимулације адхезивности ПМЋ у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ . Такође, показано је да су и свињски и говеђи хемоглобин стимулисали продукцију ROS у МНЋ и ПМЋ само у највишој испитиваној концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ .

У трећем потпоглављу приказани су резултати испитивања утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија. Резултати испитивања утицаја хемоглобина на вијабилност мезенхимских ћелија током тродневне култивације су показали да је ефекат хемоглобина, који се испољио као стимулаторан или инхибиторан, зависио од његове концентрације, али и типа ћелија и времена култивације. Свињски и говеђи хемоглобин су повећавали вијабилност ПК-ММЋ након 72 h у концентрацијама од 1 и 10  $\mu\text{M}$ . Проточна цитометрија ПК-ММЋ обојених пропидијум јодидом показала је да присуство свињског и говеђег хемоглобина није значајно утицало на број апоптотских ћелија. Међутим, број ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса у културама са хемоглобином је након 24 h био двоструко већи од њиховог броја у контролним културама. Након 48 h у култури овај ефекат се изгубио, тако да се проценат ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса у културама са додатком хемоглобина и културама гајеним само у стандардном медијуму није значајно

разликовао. Анализа клоногеног потенцијала показала је да су и свињски и говеђи хемоглобини у концентрацијама од 1 и 10  $\mu\text{M}$  смањивали број CFU-F колонија, док у концентрацији од 0,1  $\mu\text{M}$  нису утицали на клоногени потенцијал ПК-ММЋ. Затим, показано је да су све анализирани мезенхимске ћелије, примарне хумане ПК-ММЋ и мишје ћелијске линије (ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1 и C2C12), имале способност спонтане миграције и да су хемоглобини након 24 h у ћелијској култури благо стимулисали миграцију ових ћелија, при чему је интензитет стимулације зависио од врсте из које је хемоглобин изолован и типа анализираних ћелија.

Значајан део резултата ове тезе представљају резултати утицаја 0,1  $\mu\text{M}$  свињског и говеђег хемоглобина на диференцијацију ПК-ММЋ и ћелијских линија. Хемоглобини у концентрацији од 0,1  $\mu\text{M}$  су показали најмањи утицај на вијабилност и клоногени потенцијал већине анализираних мезенхимских ћелија, па је ова концентрација коришћена за испитивање хемоглобина на њихову диференцијацију. На тај начин се истовремени утицај хемоглобина на различите ћелијске процесе свео на најмању могућу меру. Резултати овог дела истраживања су показали да је присуство хемоглобина обе врсте супримирало хондрогену диференцијацију мезенхимских ћелија. Специфично, показано је да хемоглобини обе врсте додати у хондрогени медијум смањују садржај ГАГ у ПК-ММЋ за приближно 30%, што је праћено снижењем експресије *SOX9* гена. Хемоглобини обе врсте инхибирали су и хондрогену диференцијацију ATDC5 ћелија и смањивали садржај ГАГ ових ћелија, али је степен инхибиције зависио од врсте хемоглобина. Такође, показано је да хемоглобини обе врсте инхибирају и остеогену диференцијацију, како ПК-ММЋ, тако и MC3T3-E1 ћелија, пре свега кроз снижавање активности ALP, и експресије гена који кодира овај ензим. И адипогена диференцијација ПК-ММЋ након 14 дана и 3T3-L1 ћелија након 10 дана култивације била је супримирана по додатку 0,1  $\mu\text{M}$  свињског и говеђег хемоглобина у одговарајуће адипогене медијуме, уз значајно снижење експресије *PPARG* маркера и адипонектина. Анализа експресије маркера миогене диференцијације у C2C12 ћелијама гајеним у миогеном медијуму суплементисаним хемоглобином испитана је у ширем опсегу концентрација хемоглобина (0,1, 1 и 10  $\mu\text{M}$ ). Резултати су показали да ни свињски ни говеђи хемоглобин у концентрацијама од 0,1 и 1  $\mu\text{M}$  не доводе до промене експресије миогенина, док у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  долази до благог снижења експресије овог маркера, и значајног снижења експресије гена за мишићну креатин киназу. У наставку су приказани и резултати испитивања утицаја хемоглобина на имуномодулаторни ефекат ПК-ММЋ, анализом утицаја ПК-ММЋ на апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију алогених МНЋ, као и на експресију гена за неке од имуномодулаторних протеина ММЋ. Резултати показују да и свињски и говеђи хемоглобин индукују експресију *IDO1*, док је само говеђи индуковао експресију *HLA-A* код ММЋ. Резултати су показали да ПК-ММЋ утичу на апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију алогених МНЋ, а да присуство хемоглобина мења капацитет ПК-ММЋ да модулише ове функције МНЋ. Међутим, ефекат хемоглобина није био униформан и преобладајно је зависио од тога да ли су МНЋ биле добри или слаби респондери на РНА стимулацију.

У поглављу **Дискусија**, подељеном на 16 потпоглавља, добијени резултати су критички анализирани и тумачени на основу детаљно анализираних досадашњих података из литературе у вези са предметом истраживања докторске дисертације. У првом делу овог поглавља истакнута је чињеница да хемоглобин изолован из кланичне крви има одлике нативног хемоглобина. У наставку су наведени разлози за одабир одговарајућих ћелијских модела коришћених у изради ове докторске дисертације. У следећем потпоглављу дискусије објашњени су резултати (релативно мали пад концентрације хемоглобина у култури МНЋ и ПК-ММЋ након 48 и 96 h, као и одсуство експресије хем оксигеназе 1 (енг. *heme oxygenase 1*, HO-1) у ПК-ММЋ и ћелијским линијама у свим испитиваним експерименталним поставкама) који индиректно указују да је структура хемоглобина у испитиваним ћелијским културама била очувана. У наставку су продискутовани резултати који су показали смањену вијабилност МНЋ у присуству хемоглобина, као и промене способности адхезије и синтезе ROS од стране хуманих МНЋ и ПМЋ. Додатно, дат је осврт на велике индивидуалне варијације у броју колонија хематопоеетских прекурсора између донора у добијеним резултатима, који су продискутовани у светлу пионирских и новијих истраживања о утицају хемоглобина, хема и гвожђа на хематопоезу. У следећим потпоглављима дискусије сумирани су резултати утицаја хемоглобина на вијабилност и миграторни капацитет мезенхимских ћелија, што је поткрепљено већим бројем публикованих радова који су за предмет истраживања имали испитивање овог утицаја на различитим ћелијским типовима/линијама. У наставку, детаљно је дискутована способност хемоглобина да смањује диференцијациони капацитет мезенхимских ћелија ка хондрогеној, остеогеној, адипогеној и миогеној линији, што је показано како на моделу ПК-ММЋ, тако и на одговарајућим ћелијским линијама: АТDC5 ћелијама за хондрогену диференцијацију, МС3Т3-Е1 ћелијама за остеогену диференцијацију, 3Т3-Л1 ћелијама за адипогену диференцијацију и С2С12 ћелијама за миогену диференцијацију. У наставку, кандидат дискутује потенцијалну улогу фактора 1 индукованог хипоксијом (енг. *hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1), као још једног молекуларног маркера чија је експресија испитивана у оквиру ове докторске дисертације, у запаженим ефектима ванћелијског хемоглобина на способност диференцијације мезенхимских ћелија. У наставку је дискутован утицај хемоглобина на експресију имуномодулаторних гена и имуномодулаторни капацитет ПК-ММЋ који је зависио од донора МНЋ и њихове способности да одговоре на РНА стимулацију. У последњем потпоглављу, кандидат је дао завршни коментар резултата.

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

Поглавље **Литература** садржи 467 библиографских јединица. Наведени литературни извори су од значаја за области којима се бави ова докторска дисертација, правилно су и на одговарајућим местима цитирани у дисертацији.



У поглављу **Прилози** табеларно су приказани резултати испитивања утицаја хемоглобина на адхезивност МНЋ и ПМЋ сваког појединачног донора у тесту са и без пре-адхезије, као и продукције ROS у овим ћелијама. Додатно, у овом поглављу приказане су репрезентативне микрографије „огреботина“ у слоју мезенхимских ћелија након „Scratch“ теста. У наставку овог поглавља приказани су резултати који показују да хемоглобин додат у стандардни медијум не индукује хондрогену диференцијацију АТDC5 ћелија и остеогену диференцијацију ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија. Такође, приказани су резултати испитивања експресије гена који кодирају HIF-1 и HO-1 у ПК-ММЋ, АТDC5, МС3Т3-Е1 и 3Т3-Л1 ћелијама гајеним у стандардном медијуму или одговарајућим диференцијационим медијумима (хондрогени, остеогени, адипогени) без или са додатком хемоглобина у концентрацији од 0,1  $\mu\text{M}$ . На крају овог поглавља дат је списак скраћеница коришћених у овој докторској дисертацији.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

#### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. Drvenica I, **Stančić A**, Kalušević A, Marković S, Dragišić Maksimović J, Nedović V, Bugarski B, Ilić V. Maltose-mediated long-term stabilization of freeze- and spray- dried forms of bovine and porcine hemoglobin. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2019; 84 (10) 1105-1117. **(M23)**

<https://doi.org/10.2298/JSC190513067D>

Линк ка публикацији:

<https://www.shd-pub.org.rs/index.php/JSCS/article/view/8197>

2. **Stančić AZ**, Drvenica IT, Obradović HN, Bugarski BM, Ilić VLj, Bugarski DS. Native bovine hemoglobin reduces differentiation capacity of mesenchymal stromal cells *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020; 144: 909-920. **(M21a)**

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.167>

Линк ка публикацији:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019359823>

#### **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. **Stančić A.**, Drvenica I., Ilić V., Bugarski B., Bugarski D. Xenogenic hemoglobin as modulator of differentiation capacity of various cell lines, Abstract book of 4th Congress of Physiological Sciences of Serbia with international participation, 19-23 September 2018, Niš, Serbia, pp.144, ISBN 978-86-900597-0-6, Organized by: Serbian Physiological Society. **(M34)**

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Ане З. Станчић, Б3009/2013**, подвргнута је софтверској провери оригиналности 27. маја 2020. године. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили дана 27. маја 2020. године.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 25%. Детаљним увидом у Извештај утврђено је да су готово сва уочена појединачна подударања у опсегу мањем од 1%, док је подударање са 5 извора у опсегу од 1% и са једним извором у опсегу од 2%. Како због познатих ограничења Ithenticate софтвера, библиографија докторске дисертације није могла бити искључена из резултата о проценту подударности ([https://valtez.rcub.bg.ac.rs/Files/Ithenticate\\_-\\_uputstvo\\_2.pdf](https://valtez.rcub.bg.ac.rs/Files/Ithenticate_-_uputstvo_2.pdf)), уочене подударности текста се управо највећим делом односе на библиографске податаке о коришћеној литератури и њихово навођење у тексту. Додатно, уочено је поклапање у звањима чланова комисије, називима поглавља, латинским називима биолошких врста, секвенцама прајмера коришћених за RT-PCR, општепознатим скраћеницама, појединим методолошким описима, као и коришћењу кратких фраза уобичајених у српском језику, што је нужно подударање, и 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).

Узимајући у обзир наведено и Правилник о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“ број 201/18), извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Ане З. Станчић**, под насловом „**Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro***”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Ане З. Станчић** под насловом „Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*”, представља оригиналну научну студију, урађену по свим критеријумима научно-истраживачког рада. У дисертацији су приказани резултати и тумачења резултата опсежног испитивања утицаја ванћелијског хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија које представља значајни научни допринос у области биологије матичних ћелија. Ова докторска дисертација такође даје допринос биотехнолошким истраживањима о потенцијалној употреби/безбедности употребе свињског и говеђег хемоглобина (ксеногених хемоглобина) као дијететских суплемената или као саставних компоненти медијума за пропацију или конзервацију ћелија. 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 **Ани З. Станчић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*”.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 1. јул 2020. године

---

Др Александра Кораћ, редовни професор  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

---

Др Ивана Дрвеница, научни сарадник  
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

---

Др Весна Илић, научни саветник  
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања