

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 11.07.2022. године, на основу молбе ментора, др Игора Јаковчевског, научног сарадника Универзитета Витен/Хердеке-Института за анатомију и клиничку морфологију, и др Милене Милошевић, доцента Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Дуње Д. Бијелић**, студента докторских студија, под насловом: „**Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша**”, у саставу: др Павле Анђус, редовни професор Универзитета у Београду – Биолошког факултета, др Сања Дацић, доцент Универзитета у Београду – Биолошког факултета, др Тамара Дакић, научни сарадник Универзитета у Београду – Биолошког факултета и др Ива Божић, виши научни сарадник Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Дуње Д. Бијелић** под насловом „**Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша**” урађена је у Центру за ласерску микроскопију Института за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација написана је на **77 страна**. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: **Увод** (16 страна), **Циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (14 страна), **Резултати** (23 стране), **Дискусија** (6 страна), **Закључци** (1 страна) и **Литература** (16 страна, 205 библиографских јединица). Дисертација садржи **28 слика** (7 у поглављу Увод, 1 у поглављу Материјал и методе и 20 у поглављу Резултати) и **7 табела** (1 у поглављу Увод, 5 у поглављу Материјал и методе, и 1 у поглављу Резултати). Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) елементе са неопходним информацијама о докторској дисертацији: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима, члановима комисије за одбрану докторске дисертације и датумом одбране, Страну са информацијама о финансирању, Изјаве захвалности, Сажетак докторске дисертације на српском и

енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област и Ужа научна област), Листу скраћеница и Садржај. На крају дисертације су приложени следећи елементи: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Докторска дисертација обухвата седам поглавља.

Уводно поглавље докторске дисертације кандидата је подељено у четири целине и бави се прегледом научне литературе која се тиче проблематике докторске дисертације. У фокусу прве целине су повреде централног нервног система људи, нарочито кичмене мождине. Посебно је детаљан осврт на етиопатогенезу ових повреда као и биолошки одговор на повреду. Описана је каскада промена, по фазама, до којих повреда доводи, са детаљним карактеристикама сваке фазе. На месту повреде централног нервног система формира се глијални ожиљак у циљу ограничавања региона повреде, покушаја поновног успостављања хомеостазе и пређашњих функција. У том процесу учествују разне ћелијске и ванћелијске компоненте. У другој целини кандидат даје детаљан преглед ћелија које учествују у стварању глијалног ожиљка а нарочита пажња је посвећена астроцитима и ћелијама микроглије. Ванћелијске компоненте ожиљног ткива обрађене су у трећој целини уводног поглавља. Представљена су четири члана тенасцинске фамилије. Будући да се у овој докторској дисертацији испитује утицај фрагмената тенасцина-Це (TnC) на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка, детаљно је представљена структура TnC, просторни и временски обрасци његове експресије, као и многобројне функције које обавља. Уводно поглавље је закључено прегледом најчешћих стратегија које се користе за опоравак и регенерацију кичмене мождине.

У следећем поглављу **Циљеви рада**, јасно и концизно је дефинисано пет научних циљева како би се испитао ефекат различитих домена протеина тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама након механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша:

1. Праћење стопе затварања механичке повреде у култури астроцита након третмана различитим фрагментима TnC,
2. Испитивање стопе пролиферације астроцита и микроглије у моделу повреде *in vivo* и *in vitro*,
3. Испитивање морфологије и локализације ћелија у односу на регион повреде *in vivo* и *in vitro* након третмана различитим фрагментима TnC,
4. Продукција цитокина *in vitro* након третмана различитим фрагментима TnC,
5. Испитивање ефеката FnD фрагмента TnC на нисходне интерагујуће партнере.

У поглављу **Материјал и методе** кандидат темељно даје опис свих протокола, хемијских реагенаса и истраживачких метода коришћених у овој докторској

дисертацији. У почетном делу дат је табеларан преглед свих реагенаса, раствора и антитела. У експериментима су коришћени мишеви дивљег соја (TnC^{+/+}) C57BL/6 и мишеви конститутивно дефицијентни за тенасцин-Це (TnC^{-/-}). За испитивање ефеката TnC коришћени су рекомбинантно експримирани фрагменти FnA, FnC и FnD, Fn6-8 и EGFL и њихове комбинације. Кандидат је испитивао ефекат наведених фрагмената на астроците и микроглију у *in vivo* и *in vitro* моделима повреде: модел механичке повреде (енгл. Scratch wound assay, SW) у културама кортикалних астроцита и мешовитим културама, и модел компресионе повреде кичмене мождине C57BL/6 миша оба генотипа.

Кандидат је применио значајан број аналитичких, хистолошких, хистохемијских, биохемијских и молекуларно-биолошких метода, као и метода светлосне и флуоресцентне микроскопије. Затварање повреде праћено је микроскопијом светлог поља у различитим сатима до потпуног зарастања 48 сати након повреде. Методом имуноцитохемијског обележавања одговарајућих маркера утврђени су морфологија и локализација ћелијских типова у односу на регион повреде у дефинисаним временским тачкама (маркери микроглије OX42 и Iba1 и астроцита GFAP), праћена је пролиферација микроглије и астроцита у региону повреде (Ki67, маркер пролиферације), експресија ензима индуцибилне азот оксид синтазе (iNOS) и аргиназе. Методом стандардне реакције ланчаног умножавања полимеразом (PCR) детектована је експресија информационе РНК карактеристичне за одређени тип ћелија као и цитокина TNF α и IL-1 β . Нивои експресије протеина који указују на присутност одређеног ћелијског типа, степен активiranости ћелија, као и каскада сигнала путева одређивани су имуноблот техником (Western blot). Ослобађање проинфламаторних цитокина (TNF α и IL-1 β) показано је анализом медијума ћелијских култура након SW повреде методом ензимског имуноесеја (ELISA). Описани су сви поступци у анализи слика и микрографија. Квантитативна анализа потпомогнута је одговарајућим статистичким тестирањем валидности хипотезе.

У поглављу **Резултати** кандидат је изнео резултате своје докторске дисертације на прегледан и концизан начин у оквиру две тематске целине. Резултати су илустровани кроз одговарајуће графичке и табеларне презентације. У првој целини представљени су резултати примене фрагмената TnC на астроците након механичке повреде (SW модел) у кортикалној култури астроцита. Показано је да фрагменти TnC успоравају затварање повреде у култури примарних астроцита и да значајно смањују стопу пролиферације ових ћелија око места повреде. Недостатак TnC у TnC^{-/-} културама довео је до повећане експресије GFAP, интермедијарног филамента астроцита, без обзира на примењене третмане. Такође је показано да су третмани фрагментима TnC повећали експресију iRNK за проинфламаторне цитокине TNF- α и IL-1 β у култури астроцита.

У овој целини приказани су и ефекти фрагмената TnC на астроците и микроглију/макрофаге *in vivo*, у региону компресионе повреде кичмене мождине миша. Испитивани су само ефекти FnD и FnA фрагмената и њихове комбинације Fn(D+A), због показаних ефеката у *in vitro* експериментима. Показано је да FnD третман не мења укупну стопу пролиферације ћелија у региону повреде кичмене мождине мишева 7.

дана после повреде, али да код TnC-/- мишева повећава густину активираних микроглије/макрофага у региону повреде.

У другој целини кандидат је представио резултате који показују ефекат FnD третмана на астроците и микроглију у мешовитој глијалној култури. FnD третман смањује густину микроглије у одсуству TnC и смањује стопу пролиферације ових ћелија у оба генотипа у региону повреде. Испитивани фрагмент TnC, иако не утиче на пролиферацију астроцита, повећава густину ових ћелија у региону повреде 48 сати након SW. Одсуство TnC подстиче брже затварање повреде, што се није променило ни након третмана са FnD. Анализом помоћу кластера показано је да FnD третман доводи до увећања површине микроглије у региону повреде, и ова морфологија микроглије указује на активiranу форму. Испитивање експресије проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-1 β , као и експресије iNOS у мешовитој глијалној култури показало је повећања нивоа ових iRNK након FnD третмана и потврдило реактивни профил микроглије на месту повреде. Такође, третман FnD фрагментима је довео и до повећане експресије прекурсорске форме β 1 интегрина и до појаве специфичних трака карактеристичних за мономере P2Y₁₂R што додатно говори у прилог улоге коју TnC има у променама морфологије и покретљивости астроцита и ћелија микроглије.

Кандидат је дао критички осврт и анализу резултата своје докторске дисертације у оквиру поглавља **Дискусија**, ослањајући се на доступне литературне податаке. Кандидат је темељно обрадио и дискутовао све добијене резултате, изнео њихово тумачење у контексту постојећих научних сазнања и указао на значај добијених резултата за разумевање процеса који се дешавају у раним фазама на месту повреде, ћелија које у томе учествују и улоге TnC и његових фрагмената у тим процесима.

У поглављу **Закључци** кандидат је сумирао најважнија запажања која су произашла из анализе резултата његове докторске дисертације:

1. Недостатак TnC доводи до повећања пролиферације и густине микроглије у региону повреде као и груписања астроцита у граничном региону где доприносе бржем затварању повреде.
2. TnC фрагменти, а посебно FnD утичу на локализацију, густину и пролиферацију микроглије и астроцита у моделу повреде *in vitro* и *in vivo*.
 - Додати TnC фрагменти, FnD, FnA, Fn6-8, Fn(D+A) и Fn(D+A+C) доводе до успоравања затварања повреде у култури астроцита, а најизраженији ефекат уочен је након третмана са фрагментима FnD, FnA и Fn(D+A).
 - Додати TnC фрагменти, FnD, FnA, FnC, Fn6-8, EGFL, Fn(D+A) и Fn(D+A+C) смањују пролиферацију у астроцитном фронту у 24 сата након повреде у култури астроцита
 - FnD у мешовитој култури астроцита и микроглије у граничном региону смањује пролиферацију астроцита у 48 сати од повреде, док у региону повреде не утиче на пролиферацију астроцита, а подстиче њихову миграцију у повреду у истом времену.
 - FnD смањује густину микроглије у мешовитој култури астроцита и микроглије у региону повреде током 48 сати од повреде, делом на рачун смањене

пролиферације, а потенцијално и на рачун смањене миграције као и због контактне инхибиције између увећаних FnD-третираних микроглијалних ћелија.

- FnD третман не доводи до промене укупне стопе пролиферације ћелија у региону компресионе повреде кичмене мождине мишева 7 дана од индуковања повреде, али у повредама у TnC-/- мишевима доводи до повећане густине активираних микроглије/макрофага у региону повреде.
- 3. Фрагменти протеина TnC подстичу развој проинфламаторног фенотипа астроцита и микроглије *in vitro*.
- Фрагменти протеина TnC, FnD, FnA, Fnб-8 и EGFL доводе до повећане синтезе проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-1 β у култури астроцита 24 сата након повреде, док FnD такође повећава синтезу TNF- α и IL-1 β у мешовитој култури астроцита и микроглије током 48 сати од повреде.
- FnD третман утиче на развој проинфламаторне морфологије микроглије и повећање експресије iNOS.
- 4. FnD остварује улогу у промени морфологије и покретљивости ћелија потенцијално кроз повећање експресије прекурсорске форме β 1 интегрина и експресију мономера P2Y12R.

Резултати ове студије указују на комплексну и разноврсну улогу TnC, а посебно FnD фрагмента у текућој инфламацији након повреде, и просторној и временској организацији региона повреде и непосредног окружења.

У поглављу **Литература** на прегледан начин је приказано 205 библиографских јединица које су на адекватан начин цитиране у тексту при писању дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Bijelić, D., Adžić, M., Perić, M., Jakovčevski, I., Förster, E., Schachner, M., & Andjus, P. R. (2021). Different Functions of Recombinantly Expressed Domains of Tenascin-C in Glial Scar Formation. *Frontiers in immunology*, 11, 624612. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.624612>

M21

IF₂₀₂₁ = 8,786

2. Bijelić, D., Adžić, M., Perić, M., Reiss, G., Milosevic, M., Andjus, P. R., & Jakovčevski, I. (2022). Tenascin-C fibronectin D domain is involved in the fine-tuning of glial response to CNS injury *in vitro*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, doi: 10.3389/fcell.2022952208 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.952208/abstract>

M21

IF₂₀₂₀ = 6,684

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Bijelić, D., Adžić, M., Perić, M., Milošević, M., Jakovčevski, I., Andjus, PR. (2018). Involvement of tenascin-C in astrocyte scarring after CNS trauma. EuroCellNet MC meeting 2018, Brisel, Belgija, Abstract book WG4 -O-1541. **M32**
2. Bijelic, D., Adzic, M., Milosevic, M., Jakovcevski, I., Andjus, P.R. The Role of Individual Recombinant TnC Fragments in Glial Scar Formation. VII Serbian Neuroscience Society congress with international participation, Belgrade, Serbia, 25-27 October 2017. (A13), p.59. **M34**
3. Bijelić, D., Adžić, M., Perić, M., Milošević, M., Jakovčevski, I., Andjus, PR. (2018). Involvement of Individual Recombinant tenascin-C Fragments in Glial Scar Formation after CNS injury. XI međunarodni FENS kongres, Berlin, Nemačka, Abstract book F18- 3494. **M34**
4. Dunja D. Bijelic, Marija B. Adžic, Mina I. Peric, Igor Jakovcevski, Pavle R. Andjus. The role of alternatively spliced domains of tenascin-C in glial scar formation. Cold Spring Harbour Virtual Glia in Health and Disease Meeting 16 –19 July, 2020 Poster 95. **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Дуње Д. Бијелић, бр. индекса Б3021/2013, послата је дана 02.08.2022. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 02.08.2022 (у даљем тексту: Извештај).

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (у даљем тексту: Правилник) и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша”**, аутора Дуње Д. Бијелић, ментор је констатовао да утврђено подударане текста износи **9%**. Овај степен подударности последица је приложених образаца, личних имена, назива, цитата, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је појединачно подударане у већини случајева било 1% или мање.

Када се све изнето узме у обзир, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Дуње Д. Бијелић**, под насловом **„Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша”**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију **Дуње Д. Бијелић**, као и у научне публикације проистекле из резултата ове докторске дисертације, Комисија закључује да ова докторска дисертација представља оригинални научни допринос у области неуробиологије и механичке повреде централног нервног система. Резултати ове докторске дисертације откривају важне податке неопходне за разумевање улоге тенасцина-Це и његових фрагмената у просторној и временској организацији региона повреде и раним фазама формирања глијалног ожиљка. Резултати указују на комплексну и разноврсну улогу тенасцина-Це, нарочито његовог фрагмента FnD, у инфламацији на месту повреде, ефекта на брзину затварања повреде, на пролиферацију и миграцију астроцита и микроглије у региону повреде, промену морфологије ових ћелија и последичну промену експресије структурних протеина, ензима и проинфламаторних цитокина.

Имајући у виду све наведено, као и значај и могући утицај ове истраживачке проблематике на унапређење постојећих терапеутских стратегија у третирању механичких повреда централног нервног система, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију под насловом **„Утицај фрагмената тенасцина-Це на морфолошка и функционална својства астроцита и микроглије у раним фазама настанка глијалног ожиљка у моделима механичке повреде кичмене мождине и у култури ћелија миша“**, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду да овај извештај прихвати и одобри **Дуњи Д. Бијелић** јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 05.08.2022. године

др Павле Анђус, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Сања Дацић, доцент,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Тамара Дакић, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Ива Божић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја за Републику Србију.