

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

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12.03.2021. године, на основу молбе ментора, др Биљане Божић Недељковић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Адила О. Ехмедаха**, докторанда Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом: **“Утицај комплекса Бе витамина на процес неуроинфламације и регенерације периферног нерва пацова након повреде”** (енг. **„Effect of vitamin B complex therapy on process of neuroinflammation and regeneration of rat peripheral nerve after injury“**), у саставу:

1. др Биљана Божић Недељковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет
2. др Биљана Драшковић-Павловић, доцент, Медицински факултет, Универзитет одбране у Београду
3. др Владимир Башчаревић, доцент, Универзитет у Београду-Медицински факултет

Комисија је прегледала написану докторску дисертацију кандидата **Адила О. Ехмедаха** и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Адила О. Ехмедаха**, докторанда Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом: **“Утицај комплекса Бе витамина на процес неуроинфламације и регенерације периферног нерва пацова након повреде”** (енг. **„Effect of vitamin B complex therapy on process of neuroinflammation and regeneration of rat peripheral nerve after injury“**), обухвата укупно 138 страна. Нумерисани део докторске дисертације садржи 84 стране и подељен је на **седам поглавља: Увод** (15

страна), **Циљ истраживања** (две стране), **Материјал и методе** (осам страна), **Резултати** (29 страна), **Дискусија** (13 страна), **Закључци** (две стране) и **Литература** (13 страна). Дисертација садржи шест табела (све табеле су у поглављу Материјал и методе) и 25 слика (четири слике у поглављу Увод, једна слика у поглављу Материјал и методе, и 20 слика у поглављу Резултати). Поглавље **Литература** садржи 121 библиографску јединицу. Ненумерисани део докторске дисертације обухвата насловну страну на српском и енглеском језику, страну са информацијама о менторима и члановима Комисије, страну са информацијама о установама и пројектима у оквиру којих је истраживање изведено, 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 штампане и електронске верзије докторског рада, изјава о коришћењу радова проистеклих из докторске дисертације, као и штампане верзије радова проистеклих из докторске дисертације.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације **Адила О. Ехмедаха** је испитивање утицаја примене комплекса Бе витамина (Бе 1, Бе 2, Бе 3, Бе 5, Бе 6 и Бе 12) на ћелијске и молекулске компоненте процеса регенерације повређеног нерва након трансекције и реконструкције моторне гране феморалног нерва пацова. Испитана је и улога Ca_v1.2 субјединице L типа волтажно-зависних калцијумових канала у регулацији процеса инфламације и регенерације након повреде периферног нерва, као и да ли третман комплексом Бе витаминима мења његову експресију у макрофагима, Швановим ћелијама и аксонима.

Поглавље **Увод** је подељено на шест потпоглавља. У првом потпоглављу је представљен кратак преглед анатомије периферног нерва, типова повреде и процеса регенерације након повреде. Посебно је дат преглед основних карактеристика и типова L типа волтажно-зависних калцијумових канала. У другом потпоглављу дат је преглед функција и класификација Шванових ћелија, као и значај Шванових ћелија у процесу неуроинфламације и неурорегенерације након повреде периферног нерва. Потом су у следећем потпоглављу представљене функције и типови макрофага, као и њихова улога и интеракција са Швановим ћелијама након повреде периферног нерва. У наредним

потпоглављима дат је преглед основних стратегија у третману повреда периферног нерва, са посебним освртом на директну сутуру која представља најефикаснији начин хируршког лечења повређеног нерва. Последње потпоглавље Увода је посвећено додатним нехируршким терапијским приступима који се користе у циљу постизања максималног опоравка периферног нерва након хируршке реконструкције. На крају је дефинисан значај и улога витамина Бе комплекса у терапији повреде периферног нерва.

У поглављу **Циљ истраживања** дефинисан је основни циљ истраживања: испитати утицај терапије комплексом Б витамина (Бе 1, Бе 2, Бе 3, Бе 5, Бе 6, Бе 12) на (1) присуство и фенотип макрофага, (2) промену густине и типа Шванових ћелија и (3) степен израстања аксона, као и на (4) експресију $Ca_v1.2$ субјединице Л типа волтажно-зависних калцијумових канала у испитиваним ћелијама током раног периода опоравка (првих 14 дана) након повреде моторне гране феморалног нерва код пацова. Циљ истраживања је реализован кроз четири јасно дефинисана истраживачка задатка:

1. Испитати промену експресије ED1 маркера као показатеља присуства макрофага, промену експресије индуцибилне азот оксид синтазе (енгл. inducible nitric oxide synthase - iNOS), проинфламаторног цитокина фактора некрозе тумора алфа (енгл. tumor necrosis factor-alpha - TNF- α), и анти-инфламаторних цитокина интерлеукина 10 и интерлеукина 4 као диференцијалних маркера M1 и M2 макрофага;
2. Испитати експресију протеина S100 као маркера Шванових ћелија;
3. Испитати експресију протеина GAP43 који указује на интензитет израстања аксона;
4. Испитати промену експресије $Ca_v1.2$ субјединице Л типа волтажно-зависног калцијумовог канала у свим испитиваним ћелијама (макрофагима и Швановим ћелијама).

У поглављу **Материјал и методе** описан је анимални експериментални модел повреде периферног нерва који је коришћен у истраживању, као и начин и протокол примене терапије витаминима Бе комплекса. Детаљно су описане примењене експерименталне процедуре и технике, процес обраде прикупљеног ткива и припрема парафинских пресека, као и процес имунофлуоресцентног бојења препарата феморалног нерва. Наведена су и сва антитела која су коришћена за имунофлуоресцентно бојење, као

и употребљена разблажења. Описан је и процес квантификације појединачних, двоструко или троструко позитивних ћелија коришћењем ImageJ и Adobe Photoshop Creative Cloud софтвера. Добијени подаци су статистички обрађени помоћу програма SPSS (SPSS Software, Inc., САД) и графички приказани.

У поглављу **Резултати** експериментално добијени подаци, подељени у потпоглавља у односу на постављене циљеве истраживања, систематично су и јасно представљени: 1) као слике имунофлуоресцентно обојених пресека периферног нерва и 2) у виду комплексних панела састављених од слика имунофлуоресцентно обојених пресека периферног нерва и графика на којима су приказани резултати квантификације појединачних, двоструко или троструко позитивних ћелија. Сваку слику и панел прати детаљно текстуално објашњење приказаних имунофлуоресцентно обојених пресека периферног нерва и графика што олакшава сагледавање комплексних резултата.

У првом потпоглављу представљени се резултати који говоре о ефекту третмана витаминима Бе комплекса на динамику присуства и фенотипске карактеристике макрофага у моторној грани феморалног нерва пацова у периоду од 14 дана након њене трансекције и следствене реконструкције. Показано је да постоји временски зависна промена у морфологији макрофага након повреде периферног нерва, која се одликује прелазом из морфолошки карактеристичног типа М1 макрофага у морфолошки тип М2 макрофага. Овај процес се може убрзати непосредном применом витамина Бе комплекса одмах након хируршке реконструкције нерва. Додатно је показано да третман комплексом витамина Бе смањује експресију проинфламаторних молекула (iNOS и TNF- α), а повећава експресију анти-инфламаторних цитокина (интерлеукина 10 и интерлеукина 4) од стране макрофага, те је и фенотипским карактеристикама потврђен убрзани прелазак у М2 тип макрофага чиме примењена адјувантна витаминска терапија доприноси резолуцији инфламације у повређеном нерву.

Потом, у другом потпоглављу, кандидат је приказао резултате који указују на значајну интеракцију макрофага и Шванових ћелија, као два есенцијална типа ћелија у неуроинфламацији и следственој неурорегенерацији након повреде периферног нерва, као и ефекат примењене терапије витаминима Бе комплекса на Шванове ћелије и њихову интеракцију са макрофагима. Добијени резултати јасно указују да интеракција постоји само између ћелија које показују морфолошке карактеристике М2 макрофага и

немијелинизујућих Шванових ћелија, као и макрофага M2-сличне морфологије и Шванових ћелија које уклањају мијелин. Ефекат комплекса витамина Бе на оба типа ћелија био је праћен повећањем интеракције макрофага и Шванових ћелија, што је било у корелацији са регенерацијом повређеног нерва. У крајњем термину праћења периода опоравка након повреде (14. дана) уочене су блиске интеракције између M2 макрофага и Шванових ћелија, које су поређане тако да формирају Büngner-ове траке, и интензивно су обојене антителима специфичним за анти-инфламаторни цитокин интерлеукин-10.

Резултати приказани у трећем потпоглављу односе се на ефекат адјувантног третмана витаминима Бе комплекса на процес регенерације након повреде моторне гране феморалног нерва. Седам дана након повреде, нервно ткиво је оштећено, највећи део мијелинског омотача и аксона је разорен, а већина Шванових ћелија је подвргнута дегенерацији. Међутим, у групи која је након повреде и реконструкције нерва током седам дана опоравка примала витамине Бе комплекса, поред Шванових ћелија које формирају мијелин повећан је број немијелинизујућих S100⁺/GAP43⁺ Шванових ћелија које обавијају немијелинизоване аксоне малог пречника. Тај процес је значајније изражен 14. дана након повреде и третмана, када мијелинизујуће, зреле S100⁺/GAP43⁻ Шванове ћелије представљају доминантан тип ћелија, уз присуство само мањег броја S100⁺/GAP43⁺ мијелинизујућих Шванових ћелија. Додатно је у том термину опоравка уочена и интензивна експресија GAP43 у мијелинизованим аксонима великог пречника.

Последње потпоглавље је посвећено резултатима који говоре о експресији Ca_v1.2 субјединице L типа волтажно-зависног калцијумових канала у макрофагима, Швановим ћелијама и аксонима, указујући на улогу ових канала у процесу опоравка периферног нерва. Витамини групе Бе смањују експресију Ca_v1.2 субјединице L типа волтажно-зависних калцијумових канала у M1 макрофагима, а повећавају у M2 макрофагима, Швановим ћелијама и аксонима. Добијени резултати указују на улогу овог типа калцијумових канала у подстицању опоравка повређеног нерва.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су на критички начин анализирани и повезани са претходним налазима, резултати о опоравку периферног нерва након повреде, истраживачке групе у којој је кандидат урадио експериментални део своје докторске дисертације Такође, резултати су тумачени и у контексту досада познатих података из литературе повезаних са предметом истраживања којим се кандидат бавио у својој

дисертацији. Кандидат је показао самосталност и способност у тумачењу добијених резултата и разумевање њиховог потенцијалног значаја за убрзавање и побољшавање процеса неурорепарације након повреде периферног нерва.

У поглављу **Закључци** систематично су, на основу приказаних резултата, изведени закључци у складу са постављеним циљевима ове докторске дисертације.

Поглавље **Литература** садржи 121 библиографску јединицу. Наведени литературни извори су од значаја за област којом се бави ова докторска дисертација, правилно су и на одговарајућим местима цитирани у дисертацији.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ehmedah A**, Nedeljkovic P, Dacic S, Repac J, Draskovic Pavlovic B, Vucevic D, Pekovic S, Bozic Nedeljkovic B. (2019) Vitamin B Complex Treatment Attenuates Local Inflammation after Peripheral Nerve Injury. *Molecules* 24(24). pii: E4615. (M22) [doi: 10.3390/molecules24244615](https://doi.org/10.3390/molecules24244615)
Линк ка публикацији: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/24/4615>
2. **Ehmedah A**, Nedeljkovic P, Dacic S, Repac J, Draskovic Pavlovic B, Vucevic D, Pekovic S, Bozic Nedeljkovic B. (2020) Effect of Vitamin B Complex Treatment on Macrophages to Schwann Cells Association during Neuroinflammation after Peripheral Nerve Injury. *Molecules* 25(22). pii: E5426. (M22) doi.org/10.3390/molecules25225426
Линк ка публикацији: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/22/5426>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Dzopalic T, Zmijanac D, **Ehmedah A**, Djindjic B, Krstic D, Dakovic-Bjelakovic M, Bozic Nedeljkovic B. Effect of silicon dioxide enriched water during chronic ingestion of aluminum on functional characteristics of peritoneal macrophages. Forth international Conference on radiation and application in various fields of research, May 23-27, Niš, Serbia 2016. Book of abstracts. P.D.24.06. (M34)
2. Bozic Nedeljkovic B, Dacic S, Nedeljkovic P, **Ehmedah A**, Draskovic Pavlovic B, Vucevic D, Pekovic S. Vitamin B complex therapy suppresses neuroinflammation and improves recovery of injured peripheral motor nerve. 5th European Congress of Immunology, September 3-7, 2016. Amsterdam, Holand. Abstract Book. P.C.22.07. p341. (M34)

3. Pekovic S, Dacic S, Nedeljkovic P, Glamoclija S, **Ehmedah A**, Draskovic Pavlovic B, Vucevic D, Nedeljkovic P, Bozic Nedeljkovic B, Mediating Role of L-type $Ca_v1.2$ Calcium Channels in favourable effects of Vitamin B complex therapy on recovery after peripheral nerve injury. Meeting of COST action BM1406. Seillac, France. 2018. (M34)
4. Bozic Nedeljkovic B, Dacic S, Nedeljkovic P, **Ehmedah A**, Draskovic Pavlovic B, Vucevic D, Pekovic S. Vitamin B complex therapy attenuates neuroinflammation after peripheral nerve injury: A mediating role of L-type $Ca_v1.2$ calcium channels. Meeting of COST action BM1406. Seillac, France. 2018. (M34)
5. Bozic Nedeljkovic B, Dacic S, Nedeljkovic P, **Ehmedah A**, Draskovic Pavlovic B, Vucevic D, Pekovic S. Treatment with vitamin B complex improves recovery of injured peripheral motor nerve by enhancing Schwann cells maturation and macrophage polarization towards M2 phenotype. FENS Regional Meeting. 10-13 July 2019. Belgrade, Serbia. Abstract Book (electronic). Poster 260. (M34)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Džopalić T, Zmijanjac D, **Ehmedah A**, Kostić M, Đindić B, Krstić D, Božić B. Uticaj silicijum dioksidnih voda obogaćenih aronijom na funkcionalne karakteristike peritonealnih makrofaga tokom hronične ingestije aluminijuma. VII Naučni sastanak Društva imunologa Srbije. 27-28. april 2016. Beograd, Srbija, Knjiga sažetaka. str. 29. (M64)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата **Адила О. Ехмедаха, Б3006/2015**, подвргнута је софтверској провери оригиналности 12.03.2021. године. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 12.03.2021. године.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 48%. Међутим, назначени делови текста се у 18% (4253 речи) подударају са другим радом, а у 14% (3183 речи) са првим радом проистеклим из тезе, што чини укупно 32% подударности са оригиналним радовима кандидата. Забележена подударност је највећим делом у поглављима Материјал и методе и Резултати. Подударност у поглављу Материјал и методе се односи на опис коришћених процедура

које су на енглеском језику описане и у докторској дисертацији и у публикованим радовима, а због употребе стандарне терминологије за опис експерименталног модела, ознака експерименталних група, ознака примењене витаминске терапије, навођења антитела коришћених у истраживању, као и давања детаљне процедуре припреме узорка ткива, протокола за имунофлуоресцентно обележавање и анализу добијених слика. Поред тога, уочена подударност у поглављу Резултати се пре свега односи на детаљан опис резултата који је дат испод слика у коме су коришћене стандардне ознаке за ћелије, испитиване молекуле, експерименталне групе, примењену терапију и друге стандардно коришћене синтагме у оваквом типу истраживања. Сви остали индекси подударности износе мање од 1% и односе се на лична имена, опште појмове и нашироко коришћене синтагме, називе, скраћенице цитокина и испитиваних молекула, називе реагенса, широко коришћене 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.

С обзиром на наведено, а у складу са чланом 9 Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Адила О. Ехмедаха**, под насловом **“Утицај комплекса Бе витамина на процес неуринфламације и регенерације периферног нерва пацова након повреде”** (енг. **„Effect of vitamin B complex therapy on process of neuroinflammation and regeneration of rat peripheral nerve after injury“**), те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација **Адила О. Ехмедаха**, под насловом **“Утицај комплекса Бе витамина на процес неуринфламације и регенерације периферног нерва пацова након повреде”** (енг. **„Effect of vitamin B complex therapy on process of neuroinflammation and regeneration of rat peripheral nerve after injury“**) представља оригинални рад који даје значајан научни допринос у области истраживања повреде периферног нерва и додатних терапијских модалитета за побољшање процеса опоравка периферног нерва које треба даље истраживати.

Дисертација је урађена у складу са принципима научно-истраживачког рада и садржи све потребне елементе релевантне за овакав тип рада. Циљеви докторске дисертације су јасно дефинисани и применом адекватног експерименталног модела и адекватне методологије истраживања су успешно реализовани. Добијени резултати јасно указују на ћелијске и молекулске механизме који су укључени у процес опоравка повређеног периферног нерва, као и на позитиван ефекат адјувантне терапије витаминима Бе комплекса, чинећи испитивани препарат витамина Бе комплекса перспективним кандидатом за будућа клиничка истраживања, са циљем максимизовања ефеката комплексног високоспецијализованог хируршког лечења особа са повредама периферног нерва. Резултати истраживања који су представљени у овој дисертацији објављени су у међународним часописима у два оригинална научна рада из категорије М22 (ИФ₂₀₁₉ 3.267).

Имајући у виду све наведено, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Адилу О. Ехмедаху** јавну одбрану докторске дисертације под насловом **“Утицај комплекса Бе витамина на процес неуроинфламације и регенерације периферног нерва пацова након повреде”** (енг. **„Effect of vitamin B complex therapy on process of neuroinflammation and regeneration of rat peripheral nerve after injury“**).

У Београду, 05.04.2021. године

КОМИСИЈА:

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

др Биљана Драшковић-Павловић, доцент
Медицински факултет, Универзитет одбране у Београду

др Владимир Башчаревић, доцент
Универзитет у Београду-Медицински факултет