

НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Одлуком Научног већа Медицинског факултета у Београду од 16.6.2014. године за оцену докторске дисертације под називом „Ћелијски и молекуларни механизми регулације еритроцитопоезе у условима хроничног стреса“ кандидата др мед. Сање Вигњевић, одређена је Комисија у саставу:

1. Проф. др Ивана Новаковић, Генетика, Медицински факултет Универзитета у Београду.
2. Проф. др Андрија Богдановић, Хематологија, Медицински факултет Универзитета у Београду
3. ВНС др Владан Чокић, Хематологија, Институт за медицинска истраживања Универзитета у Београду
4. Проф. др Александар Савић, Хематологија, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
5. Доц. др Предраг Миљић, Хематологија, Медицински факултет Универзитета у Београду

Ментор докторске дисертације је Проф. др Мирјана Готић, а коментор Научни саветник др Мирела Будеч.

Након детаљног прегледа приложене документације, консултација са ментором, коментором и кандидатом, а према критеријумима за оцену докторске дисертације, чланови Комисије Научном већу Медицинског факултета у Београду једногласно подносе следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја докторске дисертације:

Докторска дисертација “Ћелијски и молекуларни механизми регулације еритроцитопоезе у условима хроничног стреса” написана је на 117 страна и подељена је у седам поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Дисертација садржи 41 слику, 6 табела и 223 литературна цитата.

УВОД се састоји из 4 целине и илустрован је са 8 слика. Први део увода почиње прегледом литературе везане за процес еритроцитопоезе у току развића и адултног периода и наставља се описом регулације продукције еритроцита у базалним условима и посебно у стањима повећаних потреба организма за еритроцитима - процесу означеном као стрес еритроцитопоеза. Према досадашњим сазнањима, еритропоетин, глукокортикоиди, *stem cell factor* и *bone morphogenetic protein 4* (BMP4) имају значајну улогу у регулацији стрес еритроцитопоезе која је експериментално индукована анемијом. Други део увода посвећен је стресу, врстама стресора и неуроендокрином одговору организма на стрес са посебним освртом на глукокортикоиде као медијаторе стреса. Трећи део увода обухвата интеракције између глукокортикоида и фактора инхибиције миграције макрофага (MIF) који се такође секретује у одговору на стрес. У четвртом делу увода описује се улога сигналног молекула азот монооксида (NO) у регулацији еритроцитопоезе и модулацији активности хипоталамо-хипофизо-надбубрежне осовине у току стреса.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА, јасно дефинисани и усмерени су на расветљавање ћелијских и молекуларних механизма регулације еритроцитопоезе у току хроничног психолошког стреса, обухватају: испитивање утицаја хроничног психолошког стреса на процес еритроцитопоезе у костној сржи и слезини миша, дефинисање улоге глукокортикоида у деловању хроничног стреса на различите категорије опредељених матичних ћелија за еритроцитну лозу, испитивање улоге MIF и NO-а у регулацији еритроцитопоезе у условима хроничног стреса.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани експериментални дизајн, посебно за сваки експеримент, и све примењене методе. Као модел за изазивање хроничног психолошког стреса коришћен је *restraint* који подразумева делимичну имобилизацију животиње. Ефекти хроничног психолошког стреса анализирани су различитим методама које су обухватиле: RIA, ELISA, колориметријску детекцију, културу ћелија, проточну цитометрију, имунохистохемију, морфометрију, Western blot и квантитативни RT-PCR. Статистичка обрада резултата урађена је једно- и двофакторском анализом варијансе уз примену одговарајућих *post hoc testova* и међугрупног поређења са корекцијом по Bonferroni-у. За анализу података, добијених PCR методом, примењен је REST програм.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** подељено је у 5 целина, написаних јасно и систематично, и илустровано са две табеле и 33 слике.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидат је свеобухватно и аналитично објаснио добијене резултате и повезао их са подацима из литературе. У првом делу дискусије кандидат разматра

утицај хроничног психолошког стреса на еритроцитопоезу, а у другом механизме регулације еритроцитопоезе у условима хроничног стреса. Оригинални резултати докторске дисертације који јасно указују на улогу BMP4, MIF и NO у регулацији еритроцитопоезе у току хроничног психолошког стреса објашњени су на одговарајући начин.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** наведени су најзначајнији закључци који су у складу са наведеним циљевима истраживања и добијеним резултатима.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** наведене су 223 библиографске јединице које се односе се на области значајне за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

Б. Опис постигнутих резултата

Експериментални модел хроничног психолошког стреса је дефинисан повећаном концентрацијом кортикостерона у циркулацији животиња стресираних 7 или 14 дана. Резултати докторске дисертације су подељени у пет целина. У првом делу поглавља је приказан утицај хроничног психолошког стреса на еритроцитопоезу. Анализа хематолошких параметара и статуса гвожђа је показала да хронични стрес у трајању од 7 или 14 дана значајно смањује концентрацију гвожђа и хемоглобина. Даља испитивања открила су повећање концентрације еритропоетина у циркулацији и броја BFU-E и CFU-E ћелија у костној сржи и слезини стресираних мишева. Поред промена у броју еритроидних прогенитора, у слезини стресираних животиња доказане су „стрес“ BFU-E које су карактеристичне за стрес еритроцитопоезу, описану у моделу анемије миша. У костној сржи, излагање стресу у трајању од 14 дана значајно повећава број еритроидних прекурсора CD71+Ter119+ ћелија што одговара присуству већег броја еритробластних острваца код стресираних животиња. Анализа еритробласта у слезини показала је да хронични психолошки стрес значајно повећава број CD71+Ter119- и CD71+Ter119+ ћелија, а да се након 14 дана деловања стреса запажа и пораст у броју CD71-Ter119+ ћелија. Даља цитофлуорометријска испитивања укупних Ter119+ ћелија указала су да су након 7 и 14 дана свакодневне примене стресора више заступљене незреле форме Ter119-позитивних ћелија у слезини стресираних животиња док је проценат зрелих еритроцита статистички значајно смањен у мишева стресираних 7 дана. Наведени резултати, поткрепљени стереолошком анализом која је показала тренд повећања волуменске густине

црвене пулпе у слезини стресираних мишева, јасно сугеришу да хронични психолошки стрес стимулише екстрамедуларну еритроцитопоезу.

У другом делу поглавља приказани су резултати испитивања медијатора дејства хроничног психолошког стреса на екстрамедуларну еритроцитопоезу. Тако је показано да хронични психолошки стрес, уз повећање концентрације кортикостерона и еритропоетина у циркулацији, доводи до смањења експресије глукокортикоидног и еритропоетинског рецептора у слезини што указује на активацију оба рецептора. У слезини стресираних мишева детектована је и повећана експресија с-KIT рецептора који је карактеристичан за "стрес" ВFU-Е ћелије. У оквиру испитивања медијатора еритроцитопоезе, посебна пажња посвећена је сигналном молекулу BMP4. Повећана експресија BMP4 на генском и протеинском нивоу у слезини, заједно са повећаном експресијом рецептора BMPRIa и BMPRII, недвосмислено указује на његову улогу у екстрамедуларној еритроцитопоези у току хроничног психолошког стреса. Наведени резултати први пут потврђују да еритроцитопоеза индукована хроничним психолошким стресом одговара стрес еритроцитопоези, описаној у моделу експерименталне анемије.

Блокада глукокортикоидног рецептора мифепристоном (RU486), показала је први пут да се ефекат хроничног стреса на експанзију CFU-E у слезини одвија путем овог рецептора. Даља истраживања обухватила су испитивање инхибиторних регулатора еритроцитопоезе, па је испитивана улога MIF на моделу *MIF-knock out* (MIF KO) мишева. Резултати су показали да MIF не учествује у регулацији еритроцитопоезе у костној сржи у току хроничног психолошког стреса. Међутим, у слезини, хронични стрес је изазвао већи ефекат на еритроцитопоезу код мишева којима недостаје ген за MIF у односу на *wild type* (WT) животиње. Такође, детектована је повећана експресија MIF у слезини WT мишева након 7 или 14 дана излагања стресу. Добијени резултати први пут указују на улогу MIF као негативног регулатора екстрамедуларне еритроцитопоезе у току хроничног психолошког стреса. У последњем одељку поглавља приказани су резултати испитивања улоге NO у регулацији еритроцитопоезе у костној сржи. Тако је утврђено да блокада синтезе NO са L-NAME спречава ефекат хроничног психолошког стреса на раст ВFU-E и CFU-E у костној сржи. Третман животиња само са L-NAME значајно повећава број ВFU-E и CFU-E ћелија у костној сржи сугеришући инхибиторну улогу ендогеног NO у регулацији еритроцитопоезе. Даља испитивања су показала да хронични психолошки стрес у ћелијама костне сржи значајно смањује експресију pNOS, изоформе ензима значајне за модулацију еритроцитопоезе. У складу са тим, у нуклеусној фракцији ћелија костне сржи

стресираних мишева детектована је и смањена експресија субјединице p65 транскрипционог фактора NFκB који регулише експресију NOS. Добијени резултати први пут указују на улогу NO у модулацији еритроцитопоезе у костној сржи у условима хроничног стреса.

Ц. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Резултати докторске дисертације су претежно оригинални, те се не могу директно поредити са подацима из литературе. Смањење концентрације гвожђа и хемоглобина након излагања мишева психолошком стресу у трајању од 7 или 14 дана одговара резултатима Wei и сар. (2008), добијеним код хронично стресираних пацова. Према досадашњим сазнањима, хронични стрес је основни етиолошки фактор смањене апсорпције гвожђа и последичне редукције хемоглобина. Резултати докторске дисертације јасно указују да хронично деловање хроничног *restraint* стреса повећава број еритроидних прогенитора и прекурсора у костној сржи. Сличне промене у костној сржи након хроничног деловања психолошког стресора детектовали су и други аутори (Sherstoboev и Minakova, 2005; Voorhes и сар., 2013). Осим у костној сржи, хронични психолошки стрес значајно повећава број BFU-E, CFU-E и еритробласта и у слезини, што је у складу са чињеницом да у условима повећаних потреба организма за еритроцитима долази до активације екстрамедуларне еритроцитопоезе. Такође, у најновијој студији Hernandez и сар. (2013) су показали да хронични *restraint* стрес утиче на структуру слезине тако што доводи до експанзије црвене, а облитерације беле пулпе.

У оквиру испитивања медијатора деловања хроничног стреса на екстрамедуларну еритроцитопоезу, применом блокаде глукокортикоидног рецептора мифепристоном први пут је утврђено да се експанзија CFU-E ћелија у слезини одвија посредством овог рецептора. Улога глукокортикоидног рецептора раније је доказана и у регулацији стрес еритроцитопоезе изазване анемијом код генетски модификованих $GR^{dim/dim}$ мишева код којих је онемогућена његова димеризација (Вауер и сар., 1999). Смањена експресија глукокортикоидног рецептора у црвеној пулпи слезине хронично стресираних мишева, описана први пут у докторској дисертацији, додатно потврђује његов значај у регулацији еритроцитопоезе у току хроничног психолошког стреса. Паралелно са смањеном експресијом глукокортикоидног рецептора, детектована је и смањена експресија еритропоетинског рецептора у истих животиња што уз повећане концентрације кортикостерона и еритропоетина може представљати први *in vivo* доказ њихове интеракције. Такође, на основу резултата докторске дисертације који први пут

показују повећање експресије молекула c-Kit и BMP4 и присуство „стрес“ BFU-E у слезини хронично стресираних животиња и претходно објављених података у литератури (Paulson и сар., 2011), кандидат је закључио да екстрамедуларна еритроцитопоеза индукована хроничним психолошким стресом одговара стрес еритроцитопоези изазваној акутном анемијом. Посебно је истакнута улога сигналног молекула BMP4 у регулацији еритроцитопоезе у слезини у условима хроничног психолошког стреса. Добијени резултати су у складу са тезом да у току стрес еритроцитопоезе BFU-E ћелије из костне сржи мигрирају у слезину (Paulson и сар., 2011) где под дејством специфичних сигнала микросредине постају „стрес“ BFU-E.

Након доказане активације екстрамедуларне еритроцитопоезе у току хроничног психолошког стреса, кандидат је први пут испитивао улогу MIF као потенцијалног инхибитора у регулацији стрес еритроцитопоезе. Резултати су показали да MIF не учествује у регулацији еритроцитопоезе костне сржи, али у слезини спречава прекомерну експанзију незрелих еритроидних ћелија, па кандидат закључује да је MIF негативни регулатор екстрамедуларне еритроцитопоезе у условима деловања хроничног психолошког стреса. Како у литератури нема сличних података, наведени резултати представљају оригинални допринос истраживањима механизма регулације стрес еритроцитопоезе чија би неадекватна активација могла довести до еритролеукемијске трансформације ћелија. Инхибиторно деловање MIF *in vitro* на раст еритроидних прогенитора (McDevitt и сар., 2006), као и повећање секреције MIF у току психолошког стреса (Edwards и сар., 2010) у складу су са резултатима докторске дисертације.

На бази досадашњих сазнања да NO инхибише еритроцитопоезу (Ћокић и Schechter, 2008), и да модулише активност хипоталамо-хипофизно-адреналне осовине у стресу (Mancuso и сар., 2010), у докторској дисертацији је испитивана улога овог сигналног молекула у регулацији еритроцитопоезе у костној сржи индуковане хроничним психолошким стресом. Тако је показано да инхибиција активности ензима NOS у потпуности превенира дејство хроничног стреса на еритроидне прогениторе у костној сржи. Наведени резултати, заједно са смањеном експресијом nNOS и транскрипционог фактора NFκB, који учествује у регулацији експресије овог ензима, у костној сржи хронично стресираних животиња, први пут указују на улогу NO у модулацији еритроцитопоезе у току хроничног стреса.

Д. Објављени и саопштени резултати који чине део тезе:

Објављен рад:

Vignjević S, Budeč M, Marković D, Dikić D, Mitrović O, Mojsilović S, Durić SV, Koko V, Cokić BB, Cokić V, Jovčić G. Chronic psychological stress activates BMP4-dependent extramedullary erythropoiesis. *J Cell Mol Med*. 2014 Jan;18(1):91-103. doi: 10.1111/jcmm.12167. Epub 2013 Nov 27.

Саопштења:

Vignjević S, Budeč M, Djikić D, Jovčić G, Marković D, Mitrović O, Diklić M, Breković T, Čokić V. Glucocorticoid receptor selectively mediates the expansion of erythroid progenitor cells during chronic restraint stress. 17th Congress of EHA - European Hematology Association, June 14-17, 2012, Amsterdam, Netherland [P0940] *Haematologica* 2012; 97:389.

Budeč M, **Vignjević S**, Marković D, Jovčić G, Đikić D, Mitrović O, Vranješ-Djurić S, Koko V & Čokić V (2013). Effects of chronic psychological stress on extramedullary erythropoiesis: involvement of EPOR, GR, c-kit and BMP4 signaling. 18th Congress of the European Hematology Association, June 13-16, 2013, Stockholm, Sweden [P1035] *Haematologica* 2013; 98:418.

Budeč M, **Vignjević S**, Marković D, Mitrović O, Mojsilović S, Stošić Grujičić S, Čokić V, Jovčić G. Macrophage migration inhibitory factor inhibits overexpansion of immature erythroid cells in the spleen during chronic psychological stress. 19th Congress of the European Hematology Association, June 12-15, 2014, Milan, Italy [P536] *Haematologica* 2014; 99:179.

Е. Закључак (образложење научног доприноса дисертације)

Резултати докторске дисертације др мед. Сање Вигњевић представљају оригиналан, актуелан и значајан научни допринос расветљавању ћелијских и молекуларних механизма регулације еритроцитопоезе у току хроничног психолошког стреса са посебним освртом на улогу BMP4, глукокортикоидног рецептора, MIF и NO. Добијени резултати такође отварају могућности за даља истраживања на молекуларном нивоу која би допринела бољем разумевању улоге хроничног психолошког стреса као кофактора у патогенези хематолошких малигнитета.

Ф. Предлог комисије за оцену завршене докторске дисертације

Докторска дисертација под називом „Ћелијски и молекуларни механизми регулације еритроцитопоезе у условима хроничног стреса“, кандидата др мед. Сање Вигњевић, по свом садржају и форми, добро написаном уводном делу, јасно постављеним циљевима, добро осмишљеној методологији, систематично приказаним резултатима, свеобухватној дискусији и јасно формулисаним закључцима испуњава све критеријуме добро написаног научног рада. Стога, Комисија са задовољством предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију под називом: „Ћелијски и молекуларни механизми регулације еритроцитопоезе у условима хроничног стреса“, кандидата др мед. Сање Вигњевић и одобри јавну одбрану.

Ментор:

Проф. др Мирјана Готић

Коментор:

Др Мирела Будеч, научни саветник

Чланови Комисије

Проф. др Ивана Новаковић

Проф. др Андрија Богдановић

ВНС др Владан Чокић

Проф. др Александар Савић

Доц. др Предраг Миљић

Београд, 23. јун 2014. године