

Биолошки факултет
Број захтева: 33/191-1
Датум: 11.9.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Емилија Лазих**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Анимална и хумана физиологија.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Енергетски метаболизам матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 29.03.2012. године. својим актом под бр. 02 Број: 06-17892/23-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Енергетски метаболизам матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.04.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/75-17.04.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Бато Кораћ	ванредни професор	физиологија животиња и човека	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
2.	др Драгана Вујић	ванредни професор	педијатрија, хематологија, трансплатација	Универзитет у Београду- Медицински факултет
3.	др Александра Кораћ	редовни професор	Биологија ћелија и ткива	Универзитет у Београду- Биолошки факултет

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 11. септембра 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/191-11.9.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на X редовној седници одржаној 11.9.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Емилије Лазих, под називом:

„Енергетски метаболизам матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима“.

Универзитет је дана 29.03.2012. године, својим актом под бр. 02 Број: 06-17892/23-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Veljkovic D, Vujic D, Serbic Novkovic O, Jevtic D, Zecevic Z, **Lazic E.** (2011) Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells in pediatric patients with solid tumor. *Ther. Apher. Dial.* 15: 579-586. (M23)

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној **17.04.2015.** године, прихваћен је извештај ментора др Бата Кораћа, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Драгане Вујић, ванредног професора Медицинског факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији Емилије Д. Лазић, дипломираног молекуларног биолога и физиолога, запослене у Институту за здравствену заштиту мајке и детета „Вукан Чупић“ Медицинског факултета, Универзитета у Београду као истраживач сарадник (Служба за трансплантацију костне сржи са лабораторијом за криобиологију), под насловом **„Енергетски метаболизам матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу **др Бато Кораћ**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду, **др Драгана Вујић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду и **др Александра Кораћ**, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Емилије Лазић, под насловом **„Енергетски метаболизам матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима“** садржи 109 стране. Подељена је на уобичајена поглавља: **увод** (20 страна); **циљ** (1 страна); **материјал и методе** (21 страна); **резултати** (27 страна); **дискусија** (19 страна); **закључци** (2 стране); **литература** (19 страна). Илустрована је са 10 слика и 2 табеле у уводу, 6 слика и 6 табела у поглављу материјал и методе, цц графичка прилога (12 фигура 7 слика и 1 графиком) и 9 табела у поглављу резултати и садржи 226 цитираних библиографских јединица.

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** кандидаткиња, Емилија Лазић, кроз рационално и осмишљено излагање, користећи се најновијим научним сазнањима, даје јасан преглед актуелних истраживања у свету и код нас, која се односе на проблематику докторске дисертације. Полазећи од дефинисања основних особина матичних ћелија, са акцентом на матичним ћелијама хематопоезе, кандидат нас логички уводи у поље трансплантације матичним ћелијама хематопоезе. У уводу су описани типови тумора који су предмет дисертације: хематолошки, Хочкин и Нон-Хочкин лимфом (ХЛ и Нон-ХЛ) и нехематолошки,

неуробластом (НБ) и Јуингов сарком (ЈС). Истакнуте су најважније карактеристике испитиваних малигнух тумора, као и терапеутски приступи, укључујући трансплантационе процедуре.

У другом делу увода, кандидат рационално излаже принципе организације енергетског метаболизма, чије истраживање у матичним ћелијама периферне крви јесте предмет дисертације. Дат је преглед путева разградње шећера и масних киселина (гликолиза и β -оксидација масних киселина), оксидативне декарбоксилације пирувата и циклуса лимунске киселине. Кандидат се посебно осврће на оксидативну фосфорилацију у митохондријама, организацију комплекса респираторног ланца, укључујући и синтезу АТФ у реакцији коју катализује АТФ синтаза. Као незаобилазан део кандидат износи најбитније чињенице везане за структурно-функционалну организацију митохондрија и митохондријалне ДНК.

У трећој целини увода дати су принципи организације антиоксидативне одбране у ћелијама, уз истицање прве (ензимске) линије заштите од реактивних врсти кисеоника (*енгл.* reactive oxygen species, ROS): CuZn и Mn супероксид дисмутаза (*енгл.* copper superoxide dismutase CuZn SOD и manganese superoxide dismutase, Mn SOD), глутатион пероксидазе (*енгл.* glutathione peroxidase GSH-Px) и каталазе. Посебно је истакнута њихова унутарћелијска локализација. Кандидат указује да осим респираторног ланца као места највеће продукције супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) у ћелији, важан извор јесте ензимски комплекс NOX (NAD(P)H оксидаза) који продукује $O_2^{\cdot-}$ користећи NAD(P)H за једноелектронску редукцију кисеоника. Значај ROS и реактивних врсти азота (*енгл.* reactive nitrogen species, RNS) у регулацији физиолошких процеса истанут је као важан регулаторни принцип. Са истом одмереношћу, описана је и истакнута улога IL-6 и фактора некрозе тумора (*енгл.* tumor necrosis factor, TNF) у индукцији патолошког стања или регулацији важних процеса, укључујући ћелијску диференцијацију.

Полазећи од чињенице да се још увек суочавамо са проблемима у лечењу пацијената са ХЛ, Нон-ХЛ, НБ и ЈС, да није потпуно јасно зашто постоје разлике у брзини опоравка хематопоезе (времену прихватања калема) после трансплантације код пацијената са истим обољењима, код којих су примењени истоветни мобилизациони протоколи и режими кондиционирања кандидат, као **Циљ** својих истраживања поставља могућу везу са енергетским метаболизмом ћелија. Да би се одговорило на то питање, кандидат у циљу поставља низ задатка:

1. Испитати метаболичке параметре у матичним ћелијама хематопоезе периферне крви болесника са солидним туморима (НБ, ЈС) и лимфома (ХЛ, Нон-ХЛ):

- параметре енергетског метаболизма: гликолизе, β -оксидације масних киселина, циклуса лимунске киселине, процеса оксидативне фосфорилације и саме синтезе АТФ;
- функционални статус митохондрија и ниво митохондријалне ДНК;
- експресију NOX, као важне компоненте продукције супероксид анјон радикала;
- експресију изоформи азот оксид синтаза и продукцију азот оксида;
- ниво најважнијих компоненти антиоксидативне одбране матичних ћелија хематопоезе;
- експресију IL-6 и TNF α , цитокина са мултифункционалним ефектима.

2. Упоредити резултате испитивања код пацијената без примене и после примене протокола мобилизације хематопоезних матичних ћелија костне сржи.

3. Упоредити резултате добијене из узорак обе групе пацијената са туморима, са резултатима добијених из узорак моноједарних ћелија здравих субјеката.

4. Утврдити да ли постоји узрочно-последични однос испитиваних параметара и времена прихватања калема после аутологе трансплантације матичним ћелијама хематопоезе.

Сви набројани параметри праћени су у моноједарним ћелијама периферне крви пацијената: код којих није примењен мобилизациони протокол тј. нису примили комбиновану хемиотерапију и G-CSF (*енгл.* granulocyte colony-stimulating factor); код

којих је примењен мобилизациони протокол (примили комбиновану хемиотерапију и G-CSF) и код здравих особа као контролних субјеката.

У поглављу **Материјал и методе**, Емилија Лазић детаљно описује терапеутске процедуре и експерименталне услове коришћене у дисертацији, полазећи од дефинисања пацијената и контролних субјеката, њиховог броја, дистрибуције по полу, узрасту, телесној маси и старости. Детаљно је описана припрема узорака, укључујући протокол мобилизације матичних ћелија хематопоезе, издвајање моноједарних ћелија код пацијената након мобилизационе процедуре, без мобилизационог протокола и контролних субјеката. Такође, кандидат систематично излаже начин карактеризације и утврђивања броја матичних ћелија хематопоезе проточном цитометријом (CD34+ позитивне ћелије), протокол замрзавања периферне крви богате матичним ћелијама хематопоезе, начин њихове припреме за терапију и одређивање испитиваних експерименталних параметара као и припреме за имуноцитохемију и конфокалну микроскопију. На исти начин, кандидат детаљно описује принципе тестова коришћених за одређивање вијабилности ћелија након замрзавања (Tripaу плаво и на аутоматском бројачу ћелија), као и њихов капацитет за репопулацију одређивањем броја гранулацитно-моноцитних колонија (*engl. colony-forming unit-granulocytes, G-CFU*).

У даљем делу поглавља описане су стандардне процедуре за припрему узорака (ћелија) за Western блот и qRT-PCR (*engl. quantitative real time-polymerase chain reaction*), праћено детаљним протоколима и информацијама за све параметре чија је експресија одређивана на транскрипционом и/или транслационом нивоу. Такође, конкретно су описане имуноцитохемијске и методе конфокалне микроскопије за одређивање присуства и локализације протеина у ћелијама, праћења митохондријалне функције (MitoTracker[®] Green FM) и детекције азот оксида (Daf2-DA). Квантификација и статистичка обрада резултата до којих је кандидат дошао, реализована је коришћењем адекватних софтвера и тестова.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња добијене експерименталне податке класификује у логично организоване целине, јасно графички и илустративно приказује, уз примену одговарајуће статистичке обраде. У поглављу **Дискусија**, Емилија Лазић тумачи резултате и пореди са досадашњим научним сазнањима о енергентском метаболизму, метаболичком ремоделирању и редокс регулацији матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима.

Ради бољег сагледавања, комисија у даљем делу извештаја истиче најинтересантније налазе из ова два поглавља.

У првом делу кандидат истиче да резултати докторске дисертације показују (када су у питању испитивани параметри) два доминантна метаболичка фенотипа моноједарних ћелија из периферне крви. Први фенотип карактеристичан је за моноједарне ћелије периферне крви немобилисаних пацијената, код свих испитиваних тумора. Други фенотип, истоветан је за моноједарне ћелије периферне крви мобилисаних пацијената код свих типова тумора. Ова два фенотипа одсликавају функционално стање моноједарних ћелија из периферне крви, на нивоу антиоксидативне одбране, енергетског метаболизма (гликолизе, β -оксидације масних киселина, циклуса лимунске киселине, оксидативне фосфорилације) и саме синтезе АТФ, нивоа мДНК, експресије NOX, као и експресије цитокина: IL-6 и TNF- α .

Кандидат детаљно дискутује промене које карактеришу ова два фенотипа, сагледавајући их и са аспекта могућег утицаја на време прихватања калема после урађене аутологне трансплантације матичним ћелијама периферне крви. Такав приступ је од посебног значаја имајући у виду да истраживачи покушавају да карактеришу биоенергетски индекс ћелија канцера, тј. да направе биоенергетски "потпис" ћелије канцера. "Потпис" би обухватио и описао промене на експресионим нивоима протеина

укључених у гликолизу и оксидативну фосфорилацију.

У складу са тим Емилија Лазих дискутује резулте промене експресионих профила на нивоу мРНК и на нивоу протеина, који показују снажну активацију метаболизма моноједарних ћелија периферне крви код ХЛ, НХЛ и НБ, у поређењу са контролним узорцима (моноједарне ћелије здравих особа). Истиче се да иако ове ћелије нису примарно место малигног процеса (као нпр. код леукемија), процеси који се дешавају у њима индиректно се одражавају и интереагују са бројним процесима повезаним са болешћу. Са прогресијом болести мења се пролиферативни индекс лимфоцита, долази до морфолошких промена, што је праћено имунолошким дефектом и пацијенти су осетљиви на инфекције вирусима, гљивама и протозоама.

Тако је експресија GAPDH неколико десетина пута повећана на нивоу иРНК и на нивоу протеина, код сва три типа тумора. Кандидат истиче да метаболизам испитиваних моноједарних ћелија има сличности са Варбурговим фенотипом, да је гликолитички флуks повећан и да је ова карактеристика независна од типа, карактера и порекла испитиваних тумора. Прве идеје да биохемијске промене на метаболичком нивоу карактеришу (малигне) туморе потичу од тридесетих година прошлог века када је Ото Варбург постулирао идеју да би анализа метаболичких параметара могла да обезбеди снажну основу за дијагностику малигнух тумора. Он је показао да многе туморске ћелије, у поређењу са здравим имају већу стопу гликолизе за сопствену продукцију АТФ у односу на митохондријалну (респирација), чак и у присуству кисеоника.

Кандидат истиче литературне податке да је ниво GAPDH, као једног од маркера гликолитичког пута, повећан код тумора дојке, желуца, плућа, бубрега и дебелог црева и да је то важно не само да би се обезбедио АТФ, већ и прекурсори за синтезу аминокиселина, нуклеотида, масних киселина и мембранских липида, неопходних за високопролиферирајуће ћелије. Ове резултате дисертације кандидат додатно дискутује у светлу чињенице да је гликолиза не само важан катаболички пут, већ да је посредством синтезе глукозо 6-фосфата, 3-фосфоглицерата, фосфоенолпирувата, пирувата и лактата пре свега, важна анаболичка форма метаболизма. Кандидат инкорпорира резултате до којих је дошао са постојећим сазнањима о повећању других ензима гликолитичког пута и транскрипционих фактора који су укључени у регулацију њихове експресије и метаболичком репрограмирању.

Додатно истичући аргументе који су у сагласности са тим да је метаболизам интегративан спој катаболичких и анаболичких путева, Емилија Лазих дискутује резултате дисертације који се односе на повећање протеинске експресије PDH и сукцинил-СоА синтетазе. PDH је једино место уласка угљеника глукозе из гликолитичког пута у даљу разградњу. Оксидативном декарбоксилацијом пируват се преводи у ацетил-СоА, који је супстрат циклуса лимунске киселине. На тај начин угљеници глукозе (и других шећера) се потпуно (у циклусу лимунске киселине) оксидују до воде и угљен диоксида, обезбеђујући додатно АТФ директном синтезом - фосфорилацијом на нивоу супстрата и редуковањем нуклеотидних коензима који се као супстрати користе у митохондријалној оксидативној фосфорилацији (NADH и FADH₂). То додатно повећава капацитет „туморских“ моноједарних ћелија и као „биореактора“, јер је циклус лимунске киселине централно место интермедијерног метаболизма. Слично интермедијерима гликолитичког пута, интермедијери циклуса лимунске киселине су важни прекурсори за цео спектар биомолекула: цитрат - масне киселине, стероли; α-кетоглутарат-амино киселине, пурини; сукцинил-СоА - порфирини, хем; оксалацетат - аминокиселине, пиримидини, глукоза. Кандидат истиче да је метаболичко репрограмирање у моноједарним ћелијама пацијената са ХЛ, НХЛ и НБ синхронизовано да обезбеди и енергију и биомасу у таквим, малигном трансформацијом, измењеним условима. Томе у прилог иду и резултати дисертације да је улазак угљеничних јединица у циклус лимунске

киселине интензивирају и из главног извора, масних киселина. Експресија (на протеинском нивоу) ацил-СоА дехидрогеназе средњег ланца већа је у моноједарним ћелијама два пута код ХЛ, а скоро четири пута код пацијената са НХЛ и НБ. На основу овог налаза Емилија Лазих закључује да је појачан улазак угљеничних јединица из масних киселина у циклус лимунске киселине. Интензивирањем β -оксидације масних киселина, интензивирани су метаболички процеси у митохондријама, где се овај катаболички пут одиграва. Појачан улазак угљеничних јединица од масних киселина у циклус лимунске киселине, усмерен је ка обезбеђивању АТФ из оксидативне фосфорилације.

Резултати дисертације указују на неопходност метаболичке синхронизације у моноједарним ћелијама пацијената са НЛ, НХЛ и НБ. На нивоу иРНК, експресија скоро свих испитиваних компоненти комплекса респираторног ланца и АТФ синтазе је изразито повећана (једино нема промена експресије код пацијената са НБ за субјединице комплекса IV кодиране било митохондријалним или нуклеусним генима). Експресиони профили за протеине кодиране митохондријалним генима истоветни су са испитиваним генима из нуклеуса. Количина митохондријалне ДНК у моноједарним ћелијама показује скоро истоветан образац у поређењу са експресијом компоненти респираторног ланца, двадесет пута је већа код пацијената са ХЛ, десет са НХЛ и показује повећање код пацијената са НБ. На нивоу протеина детектован је истоветан одговор као код иРНК. Експресија протеина и иРНК је изразито повећана. Једини изузетак је значајно смањење цитохрома *c* у односу на ниво иРНК код пацијената са ХЛ, НХЛ и НБ туморима.

На основу свега тога кандидаткиња истиче да су добијени резултати у складу са претходно поменути променама на нивоу гликолизе, β -оксидације масних киселина, оксидативне декарбоксилације пирувата и циклуса лимунске киселине тј. да поред обезбеђивања неопходних прекурсора за биосинтетске процесе, интензивирање оксидативне фосфорилације у моноједарним ћелијама периферне крви код пацијената са туморима обезбеђује енергију за те и за друге процесе. Важна је и констатација кандидата да метаболичка симбиоза моноједарних ћелија није само карактеристика пацијената студираних у дисертацији, већ је одлика нормалних, физиолошких стања, али је посебно развијена код тумора.

С друге стране резултати дисертације показују да се метаболички фенотип матичних ћелија хематопоезе периферне крви после примене мобилизационог протокола код свих пацијената карактерише скоро потпуним гашењем испитиваних параметара у односу на вредности нађене у ћелијама здравих особа и пацијената који нису добијали мобилизациони протокол. Изузетак је ниво цитохрома *c* на иРНК нивоу и комплекса IV на протеинском нивоу. Кандидаткиња истиче да ове ћелије карактерише низак ниво гликолизе, β -оксидације масних киселина, циклуса лимунске киселине, оксидативне фосфорилације и саме синтезе АТФ, као и нивоа мДНК и експресије NOX. Емилија Лазих, дискутујући ове промене са разлогом истиче дилему у којој мери се овај налаз може сматрати смањењем када се пореди са резултатима у немобилисаним моноједарним ћелијама, а у којој је мери реално стање мобилисаних матичних ћелија хематопоезе. Због недостатка информација у литератури, кандидат дискусију ових промена усмерава ка поређењу са доступним резултатима који се односе на матичне ћелије хематопоезе костне сржи, њихове ћерке ћелије и мобилисане матичне ћелије, истичући да постоји могућност да мобилизационе процедуре могу утицати на функцију матичних ћелија хематопоезе периферне крви на различитим нивоима.

Развој хематопоетских ћелија и неких ћелија лимфоидне популације примарно је ограничен на костну срж, док зреле ћелије напуштају место настанка и улазе у периферну циркулацију. У хомеостатским стањима мала популација хематопоетских стем ћелија (ХСћ) и хематопоетских прогениторских ћелија (ХПћ) је присутна у периферној крви. Запажање да се повећан број ХПћ налази у крви пацијената који се опорављају од

хемиотерапије, довело је до развоја процедура да се ове незреле ћелије мобилишу из костне сржи до крви, из које се могу сакупити и користити за трансплантацију. Баланс између мировања и пролиферације чврсто је контролисан унутрашњим механизмима у ХСЋ и интеракцијама ХСЋ са специфичном микросредином, нишом матичних ћелија, интеракцијом ћелија - ћелија, ћелија - ванћелијски матрикс и рецептор - лиганд интеракција.

Мировање обезбеђује очување интегритета и функције ХСЋ ограничавајући оштећења ћелија током митохондријалне респирације, као и од цитотоксичних агенаса. Такође, штити ХСЋ од исцрпљивања услед претеране пролиферације, тј. уласка у неконтролисане ћелијске циклусе. Свако од различитих стања ХСЋ (мировање, пролиферација и диференцијација) намеће јединствене биоенергетске захтеве. Емилија Лазих у дисертацији дискутује добијене резултате поредећи их са досадашњим сазнањима о метаболичким профилима ХСЋ у овим стањима. Истиче се да ХСЋ у стању мировања (утишаности) имају склоност ка анаеробном метаболизму. Мада ХСЋ имају велики број митохондрија, оне су мало активне са ниским митохондријалним мембранским потенцијалом и нивоом АТР, и са доминацијом гликолитичког пута у односу на оксидативну фосфорилацију и циклус лимунске киселине. Опредељеност ХСЋ да ли ће остати у стању мировања или ће ући у деобу повезана је и са метаболизмом липида. Када ХСЋ напуштају стање мировања и враћају се у ћелијски циклус, избор између асиметричне и симетричне поделе је једна од првих важних одлука која одређује њихову судбину. Асиметричном поделом настају две ћелије са различитим судбинама, што омогућава одржавање пула ХСЋ и стварање диференцираних прогениторских ћелија за одржање хомеостазе крви. Супротно, симетричном поделом стварају се две ћелије са заједничком судбином где могу или одржавати пул ХСЋ, или повећати број диференцираних ћелија у стањима која захтевају интензивну хематопоезу. Истраживања указују на могућност да је оксидација масних киселина кључна одредница судбине ХСЋ и активирање оксидације масних киселина утиче на опредељење ХСЋ, омогућавајући асиметричну ћелијску деобу која је енергетски више зависна од симетричне ћелијске деобе. Важно је напоменути да блокада оксидације масних киселина доводи до диференцирајуће ћелијске деобе, пре него само-обнављајуће симетричне деобе.

Резултати дисертације указују да је оксидација масних киселина изразито ниска код испитиваних узорака матичних ћелија из периферне крви, насупрот повећању код диференцираних моноједарних ћелија (контролни узорци здравих испитаника). Очигледно да метаболизам масних киселина има дијаметрално супротан профил када се посматра (зависно од природе деобе), у мобилисаним матичним ћелијама хематопоезе и потпуно диференцираним хематопоезним ћелијама.

Иако резултати указују на јасну корелацију између митохондријалног метаболизма, пролиферације и диференцијације, кандидат истиче да још увек немамо довољно сазнања о механизмима који контролишу ове процесе.

Како данашња сазнања усмеравају истраживања на промене редокс стања ћелија и нивое ROS као могуће регулаторе усмеравања ХСЋ или у правцу самообнављања или у правцу диференцијације, Емилија Лазих дискутује своје резултате у том светлу, посебно имајући у виду да је количина мДНК повећана у моноједарним ћелијама код немобилисаних, а смањена код мобилисаних пацијената са НХЛ и ЕС, али без значајних промена код пацијената са НХ и НБ.

Већина ћелија сисара садржи 1000 до 10 000 копија мДНК, док зрела јајна ћелија сисара садржи око 100 000 копија, при чему свака митохондрија садржи 2 - 10 копија. Током спонтане диференцијације мишићних ембрионалних матичних ћелија, број копија мДНК се шестог дана повећава 100 пута. Код хуманих ембрионалних матичних ћелија спонтана диференцијација повезана је са повећањем броја копија мДНК од два пута. Са

диференцијацијом долази и до повећања потрошње кисеоника, као и продукције АТР и ROS у митохондријама. Може се рећи да ове ћелије одржавају константно низак ниво копија мДНК у недиференцираном стању, а током иницијације диференцијације долази до повећања митохондријалне биогенезе и броја копија мДНК, што је праћено активацијом оксидативног метаболичког профила. То је у складу са резултатима дисертације када се посматрају промене нивоа мДНК, где је изразито повећање показано у моноједарним ћелијама код немобилисаних пацијената са ХЛ и НХЛ и благо повећање код НБ. Повећање нивоа мДНК праћено је изразитом метаболичком активношћу, посебно повећањем оксидативног метаболизма у митохондријама. Супротно томе, низак ниво мДНК у узорцима пацијената који су примали мобилзациони протокол праћен је ниским нивоом оксидативног митохондријалног метаболизма.

ХСЋ су највише испитиване матичне ћелије, са јасно дефинисаним маркерима диференцијације, али недовољно истраженим метаболичким профилем. Стога је испитивање метаболичке регулације, како код самообнављања, тако и диференцијације додатни императив. Чињеница је да ХСЋ имају редукован број митохондрија, ниску митохондријалну респирацију, са гликолизом као доминантним метаболичким путем.

Једно од кључних питања које кандидат разматра у дискусији резултата дисертације је како ХСЋ инхибирају функцију митохондрија и аеробни метаболизам када су мобилисане и налазе се у циркулацији где је концентрација кисеоника много већа него у ниши костне сржи?

Емилија Лазић приступа овом проблему повезујући резултате дисертације са могућом улогом митохондријалног статуса, оксидативне фосфорилације и продукције ROS као важних регулаторних фактора. Кандидат истиче улогу редокс статуса и концентрације кисеоника у детерминацији сва три стања код неуроналних стем ћелија (НСЋ). Указује се да постоји динамичка контрола доступности кисеоника НСЋ у нишама и да стања са нижим концентрацијама кисеоника стимулишу пролиферацију и самообнављање, док повећање парцијалног притиска кисеоника промовише диференцијацију или апоптозу НСЦ и прогенитора. Интрацелуларно продуковане ROS активацијом NOX промовишу неуроналну диференцијацију. Потврда томе је налаз да инхибиција продукције ROS, инхибицијом ензимске активности NOX, негативно регулише диференцијацију НСЋ. Слични механизми и интеракција на нивоу кисеоника, ROS и NOX одговорни су за развој неуробластома. Резултати дисертације показују да је експресија NOX у мобилисаним матичним ћелијама хематопоезе скоро потпуно угашена на нивоу иРНК, а изразито смањена на нивоу протеина.

Диференцијација хематопоеских ћелија захтева оксидативни свич. Прелазак ХСЋ у више пролиферативно стање, повезано са диференцијацијом, намеће посебне метаболичке захтеве. Ћелије у фази пролиферације не само да морају да стварају енергију, већ морају и да активирају велики број биосинтетских процеса потребних за репликацију. Другим речима, диференцијација захтева висок енергетски инпут да би се одржале специјализоване функције сваког зрелог ћелијског типа. Адаптација на високо-енергетско стање се ослања на ремоделирање митохондрија. Мада се о свему томе мало зна када говоримо о ХСЋ, диференцирани адултни кардиомиоцити и прекурсори неурона имају структурно зреле митохондрије, дифузно распоређене у цитоплазми. Структурно ремоделирање митохондрија праћено је повећањем репликације митохондријалне ДНК. Дакле, способност ХСЋ да се диференцирају зависи од њихове способности да активирају митохондријалну оксидативну фосфорилацију.

Промене на нивоу митохондрија кандидат повезује са редокс регулацијом и променама нивоа антиоксидативних ензима: GSH-Px, CuZn SOD, Mn SOD и каталазе, истичући да и њихова унутарћелијска локализација има важну улогу у регулацији нивоа ROS, посебно водоник пероксида.

Дискутујући утишани метаболички фенотип са аспекта потентности прихватања калема гранулоцитне и мегакариоцитне лозе након аутологне трансплантације, Емилија Лазић, на основу резултата дисертације истиче да не постоји јасна корелација између њих. Наиме, прихватање калема обе лозе је индивидуално и временски различито код пацијената и независно од врсте тумора. Могуће је да метаболички фенотип матичних ћелија периферне крви поседује различите индивидуалне потенцијале да се експримира у зависности од општег стања пацијента, степена прогресије болести, инфекција и специфичности микросредина које могу утицати на време прихватања калема.

Комисија жели да истакне и резултате који се односе на промене експресије два цитокина: IL-6 и TNF- α . На протеинском нивоу, њихова експресија је изразито повећана у моноједарним ћелијама код свих испитиваних група пацијената, без обзира да ли су примали мобилизациони протокол или не. Кандидат истиче да плејотропни цитокини, IL-6 и TNF- α , имају важну улогу у покретању и синхронизацији комплексних догађаја у моноједарним ћелијама, диференцираним и недиференцираним, зависно од патолошког стања и интеракције са другим ћелијским факторима и цитокинима, пре него да је повећање њихове експресије последица индукованог инфламаторног одговора.

У поглављу **Закључци** детаљно су сумирани добијени резултати из докторске дисертације и истакнути најважнији. Они логично следе добро поткрепљену дискусију. Комисија их сажима и овде износи у уопштенијем облику.

На основу добијених резултата можемо закључити да се издвајају два доминантна метаболичка фенотипа моноједарних ћелија из периферне крви. Један је карактеристичан за моноједарне ћелије периферне крви код свих испитиваних тумора, хематолошких (ХЛ и НХЛ) и нехематолошких (НБ и ЕС). Други "фенотип", истоветан је за моноједарне ћелије свих типова тумора после протокола мобилизације са G-CSF.

1. Код првог метаболичког фенотипа експресиони профили на нивоу иРНК и на нивоу протеина показују снажну активацију метаболизма моноједарних ћелија периферне крви код ХЛ, НХЛ и НБ у поређењу са контролним субјектима. Уочава се синхронизација метаболичких процеса у моноједарним ћелијама пацијената са ХЛ, НХЛ и НБ:

- На нивоу иРНК, експресија свих испитиваних компоненти комплекса респираторног ланца и АТР синтазе је изразито повећана (једино нема промене експресије на нивоу иРНК код пацијената са НБ за субјединице комплекса IV кодиране било митохондријалним или нуклеусним генима);
- Експресиони профили за протеине кодиране митохондријалним генима истоветни су са испитиваним генима из нуклеуса;
- Количина митохондријалне ДНК у моноједарним ћелијама показује скоро истоветан образац у поређењу са експресијом компоненти респираторног ланца, двадесет пута је већа код пацијената са ХЛ, десет са НХЛ и показује тренд повећања код пацијената са НБ;
- На нивоу протеина детектован је истоветан одговор као код иРНК. Експресија је изразито повећана. Једини изузетак је, супротно променама на нивоу иРНК, драматично смањење цитохрома *c* код пацијената са ХЛ, НХЛ и НБ туморима.

2. Активација оксидативног метаболичког профила (посебно у митохондријама) праћена је повећањем митохондријалне биогенезе и броја копија мДНК у моноједарним ћелијама код пацијената са ХЛ и НХЛ (са трендом повећања код НБ).

3. У другом случају, метаболички фенотип моноједарних ћелија периферне крви после мобилизације хемиотерапијом и G-CSF (уз изузетак цитохрома *c* на иРНК нивоу и комплекса IV на протеинском нивоу) код свих пацијената карактерише се скоро потпуним гашењем испитиваних метаболичких параметара (утишани фенотип) када се вредности пореде у односу на здраве особе и пацијенте који нису примали МП. Такође, карактерише их смањен ниво мДНК.

4. На нивоу антиоксидативне одбране, код свих испитиваних група пацијената, смањена је експресија на протеинском нивоу за GSH-Px, док се експресиони нивои каталазе и Mn SOD одржавају на контролном нивоу. Експресија CuZn SOD, смањена је код пацијената који су примали МР. Уз то, смањена је експресија NOX код свих испитиваних пацијената.
5. Експресија цитокина, IL-6 и TNF- α на протеинском нивоу изразито је повећана у моноједарним ћелијама код свих испитиваних група пацијената, са и без стимулације матичних ћелија хематопоезе.

На основу резултата дисертације може се закључити да не постоји јасна корелација између утишаног метаболичког фенотипа и времена прихватања калема гранулоцитне и мегакариоцитне лозе после аутологне трансплантације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M23**

Veljkovic D, Vujic D, Serbic Novkovic O, Jevtic D, Zecevic Z, **Lazic E.** (2011) Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells in pediatric patients with solid tumor. *Ther. Apher. Dial.* 15: 579-586.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34**

Vujic SD, Lazic E, Stancic A, Otasevic V, Vucetic M, Jankovic A, Buzadzic B, Zecevic Z, Korac A and Korac B. Metabolic changes in peripheral blood stem cells of Pediatric patients for autologous transplantation with different type of cancer. 40th Anniversary Edition of the EBMT Annual Meeting, 30 March-2 April 2014, Milan, Italy. *Bone Marrow Transplantation* 2014, 49: s491.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Емилије Лазић**, под називом: „**Енергетски метаболизам матичних ћелија хематопоезе периферне крви болесника са малигним обољењима**“, представља не само значајан научни допринос разумевању одржања енергетског тј. метаболичког статуса матичних ћелија, већ и терапеутског потенцијала и успешности аутологне трансплантације код хематоонколошких обољења. Предвиђена испитивања су у потпуности реализована, доприносе налажењу одговора који се тичу механизма деловања G-CSF како у мобилизацији, тако и у диференцијацији и функционалној активацији матичних ћелија хематопоезе. Резултати који се односе на метаболичко репрограмирање матичних ћелија хематопоезе престављају добар основ за даље унапређивање терапеутских протокола за аутологу трансплантацију, важну за успостављање тумор-специфичне терапије и разумевање механизма који одређују различит одговор у различитим туморима на исту терапијску процедуру. Молекулски механизми који из тога произилазе додатно указују на редокс зависну регулацију и улогу

коју реактивне врсте кисеоника и азота имају у индукцији, активацији и диференцијацији матичних ћелија хематопоезе и отварају пут за нове приступе и молекулске таргете у терапији тумора.

Познавајући Емилију Лазић, Комисија жели да истакне напредак и зрелост кандидата на свим аспектима компетентности научног рада. Објављени научни радови из докторске дисертације то и потврђују.

Такође, Комисија истиче још један допринос докторске дисертације, а то је да поред многих одговора које је дала, сагласно сваком правом научном делу, отвара нове истраживачке путеве. На основу изложених чињеница у вези докторске дисертације Емилије Лазић, које указују на квалитет и научни допринос постигнутих резултата, имајући у виду да су веома обимни задаци постављени у циљу овог истраживања испуњени и верификовани кроз објављене радове у часописима међународног значаја, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и омогући Емилији Лазић да јавно одбрани своју докторску дисертацију.

КОМИСИЈА:

др Бато Кораћ, ванредни професор БФ
Универзитета у Београду

др Драгана Вујић, ванредни професор МФ
Универзитета у Београду

др Александра Кораћ, редовни професор БФ
Универзитета у Београду

У Београду, 05.08.2015. године