

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.06.2016. године, прихваћен је Извештај ментора др Хуана Франциска Сантибањез Домингеца и др Милене Катарановски о урађеној докторској дисертацији магистра биолошких наука Соње С. Мојсиловић, истраживача сарадника у Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом **„Утицај про- и анти-инфламацијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишјих макрофага“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. Др Милена Катарановски, редовни професор, Биолошког факултета, Универзитета у Београду, научни саветник Института за биолошка истраживања Универзитета у Београду
2. Др Хуан Франциско Сантибањез Домингез, научни саветник, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду
3. Др Драгана Вучевић, научни саветник, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета одбране

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација мр Соње С. Мојсиловић, под називом **„Утицај про- и анти-инфламацијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишјих макрофага“** својом темом, циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем, представља оригинални истраживачки допринос разумевању биологије и молекуларних механизма регулације протеаза ванћелијског матрикса у мишјим макрофазима.

Докторска дисертација мр Соње С. Мојсиловић урађена је у Лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду. Процедуре рада са животињама су одобрене од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња истог Института (решење бр. 323-07-06070/2015-05/1).

Докторска дисертација под наведеним насловом написана је на 129 страна и садржи следећа поглавља: Увод (34 стране), Циљеве (2 стране), Материјал и методе (19 страна), Резултате (28 стране), Дискусију (19 страна), Закључке (2 стране) и Литературу (25 страна). У прегледу литературе наведено је 226 библиографских јединица.

## Анализа докторске дисертације:

**УВОД** докторске дисертације мр Соње Мојсиловић садржи шест целина које дају увид у досадашња истраживања макрофага и њихових функционалних карактеристика. **У првом делу**, дат је општи приказ моноклеарног система фагоцита са посебним акцентом на моноците и макрофаге. Укратко је изнесен историјат истраживања и систематизације фагоцита. Затим су описана нова сазнања о пореклу макрофага, и дат детаљан приказ савремених схватања о разноврсности моноцитно-макрофагног система. **Други део** је посвећен улози макрофага у инфламацији и туморима. Дат је кратак осврт на основне одлике, као и физиолошки и патолошки значај инфламацијског одговора и описана улога макрофага у овом процесу. Затим је дат приказ особина макрофага и њихове улоге у туморској микросредини. **У трећем делу** су описани најважнији молекуларни механизми укључени у активацију макрофага, са посебним освртом на нуклеарни фактор капа Б (NFκB), и дат је општи приказ карактеристика и функција липополисахарида (LPS) Грам-негативних бактерија и трансформишућег фактора раста бета (TGF-β), као најчешће испитиваних медијатора урођене имуности у процесу покретања, односно резолуције инфламације. **У четвртом делу** је дат преглед најважнијих сазнања о покретљивости макрофага и улози протеаза ванћелијског матрикса [(које су тема ове дисертације – урокиназни тип активатора плазминогена (uPA) и матриксна металопротеиназа 9 (MMP-9)] у овом процесу. **У петом делу** се даје кратак приказ макрофагних ћелијских линија које се користе у *in vitro* истраживањима са посебним акцентом на RAW 264.7 ћелијску линију која се користи у истраживањима у оквиру дисертације. **Шеста целина** обрађује лекове који утичу на тубулински цитоскелет и глукокортикоиде, тачније паклитаксел, естрамустин фосфат и дексаметазон, као неке од лекова који се користе у терапији тумора, а могу бити од значаја за разумевање улоге макрофага у процесу развоја тумора.

У складу са постојећим сазнањима, али и проблематиком у овој области, постављени су јасно дефинисани следећи **ЦИЉЕВИ** истраживања ове дисертације:

1. Испитивање утицаја LPS на продукцију uPA у макрофагима и могући пут трансдукције сигнала.
2. Испитивање утицаја TGF-β на продукцију MMP-9 и uPA у макрофагима и могући пут трансдукције сигнала.
3. Испитивање маркера функционалне диференцијације макрофага у M1 или M2 тип након третмана LPS и IFN-γ или IL-4.
4. Испитивање утицаја IFN-γ и IL-4 на продукцију MMP-9 и uPA у макрофагима.
5. Испитивање ефекта антитуморских лекова паклитаксела и естрамустин фосфата на миграторни потенцијал и продукцију uPA у TGF-β стимулираним макрофагима.
6. Испитивање ефекта дексаметазона на продукцију uPA у макрофагима и могући пут трансдукције сигнала.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описане су биохемијске методе и методе ћелијске и молекуларне биологије које су коришћене у реализацији постављених циљева. Најпре су наведени медијуми за култивацију ћелија, антитела, реагенси и прајмери који су коришћени у експерименталним процедурама. Потом су наведене ћелије које су коришћене у експериментима, односно моноцитно/макрофагна ћелијска линија RAW 264.7 као и начин изоловања и добијања макрофага из костне

сржи мишева соја *СВА*. Следи опис метода које су коришћене за анализу. Детаљно су објашњене примењене технике: МТТ тест за одређивање вијабилности ћелија, метод бојења CFSE бојом за одређивање пролиферације на проточном цитометру, поларизација макрофага у М1 и М2 фенотипове, Грисова реакција за одређивање продукције азот монооксида, цитохемијска и имуноцитохемијска бојења, *BCA* метод за одређивање протеинске концентрације у ћелијским лизатима, зимографија за одређивање активности ензима, изолација једарних протеина, анализа ћелијских протеина методом Western Blot, анализа генске експресије методом RT-PCR, и луциферазни репортер тест помоћу којих је утврђивана експресија MAPK или Smad3. Миграциони потенцијал RAW 264.7 ћелија је испитан *in vitro* тестом зарастања ране и миграционим тестом са Бојденовом комором. Резултати су анализирани у програму Microsoft Excel. За одређивање вероватноће значајности разлике између два узорка коришћен је Студентов *t*-тест. Статистички значајном је сматрана вероватноћа мања од 0,05.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, кандидаткиња је систематски и јасно изложила резултате извршених истраживања. Руководећи се постављеним циљевима резултати су подељени у шест целина, у којима су на прегледан начин и графички документовано изнети добијени експериментални подаци, који су приказани у 26 слика.

У **првом делу** приказани су резултати утицаја LPS (100ng/ml у ћелијској култури) на регулацију експресије uPA у RAW 264.7 ћелијама. Резултати су јасно показали да третман LPS умањује продукцију uPA, за разлику од MMP-9 чију експресију подстиче. Ефекат LPS на експресију uPA потврђен је RT-PCR анализом која је показала редукцију uPA транскрипта. Применом специфичних хемијских инхибитора сигналне трансдукције индуковане путем LPS, уочено је да је инхибиција p38 MAPK онемогућила инхибиторни ефекат LPS на продукцију uPA. ERK1/2 и JNK1/2 нису имали утицаја на ефекат LPS, али је инхибиција ових сигналних путева редуквала базалну експресију uPA. Western blot анализа је у експерименталним условима показала да је p38 главна MAPK коју активира LPS, док ERK1/2 и JNK1/2 слабо активира LPS третман. Ови резултати сугеришу да LPS путем p38 MAPK инхибира продукцију uPA у RAW 264.7 макрофазима.

У **другом делу** су приказани резултати утицаја TGF- $\beta$  (5ng/ml у ћелијској култури) на регулацију експресије uPA и MMP-9 у RAW 264.7 ћелијама. Резултати добијени зимографијом и RT-PCR анализом су показали да TGF- $\beta$  инхибира експресију MMP-9. Са друге стране, увећање експресије uPA путем TGF- $\beta$  зависило је од *de novo* протеинске синтезе, што је показано применом циклохексимида. У циљу расветљавања молекулских механизма који су у основи различитог утицаја TGF- $\beta$  на експресију uPA и MMP-9, анализиран је пут трансдукције TGF- $\beta$  сигнала у ћелији. Показано је да TGF- $\beta$  покреће Smad2/3 сигнални пут, као и ERK1/2 MAPK, док на p38 и JNK1/2 има слаб утицај. Интересантно је да TGF- $\beta$  третман умањује премештање NF $\kappa$ B p65 субјединице из цитоплазме у једру, док истовремено увећава премештање p50 субјединице у једру уз значајан пораст експресије p105, p50 прекурсора. Даље, специфични хемијски инхибитори су примењени са циљем да расветле учешће појединих TGF- $\beta$  сигналних путева у продукцији uPA и MMP-9. Зимографија и RT-PCR анализа су показали да су Smad3 и ERK1/2 главни сигнални путеви укључени у пораст експресије uPA, док JNK1/2 и NF $\kappa$ B учествују углавном у регулацији базалног нивоа експресије ове протеазе. Истовремено, без обзира који је инхибитор примењен, није уочено блокирање инхибиторног утицаја TGF- $\beta$  на MMP-9. Међутим, запажање да је TGF- $\beta$  истовремено инхибирао једарну транслокацију p65, а стимулисао транслокацију p50 и експресију p105, сугерише да би TGF- $\beta$  могао инхибицијом NF $\kappa$ B сигнала да оствари свој инхибиторни утицај на MMP-9 експресију.

У **трећем делу** је испитан утицај истовременог дејства LPS и TGF- $\beta$  на продукцију uPA у RAW 264.7 ћелијама. Анализа зимографијом је показала да инхибиција продукције uPA од стране LPS није у могућности да умањи стимулаторни капацитет који TGF- $\beta$  има на продукцију uPA. Ово би могло да буде од значаја за реакцију макрофага на присутно оштећење ткива у фази прелаза из про-инфламацијске ка анти-инфламацијској средини.

У **четвртном делу**, у циљу расветљавања експресије uPA и MMP9 током макрофагне активације/поларизације, макрофази су класично (M1) и алтернативно (M2) активирани применом LPS и INF- $\gamma$ , односно IL-4. RAW 264.7 ћелије и примарни макрофази костне сржи су након третмана LPS и INF- $\gamma$  имали повећану експресију и активност iNOS својствену M1 функционалном фенотипу макрофага, док је третман IL-4 у овим ћелијама увећао експресију аргиназе-1 која одликује M2 функционални фенотип. M1 поларизоване RAW 264.7 ћелије су имале смањену продукцију uPA. У ћелијама третираним TGF- $\beta$  је порасла експресија uPA, али је у ћелијама третираним IL-4 ова експресија била инхибирана. Исти третман макрофага из костне сржи је показао да M1 поларизација истовремено редукује продукцију uPA а стимулише продукцију MMP-9. Индукција M2 функционалног фенотипа применом IL-4 је изазвала повећање продукције uPA, док на продукцију MMP-9 није имала значајан утицај.

У **петом делу** је, с обзиром на значај макрофага у канцерогенези, испитан ефекат анти-туморских лекова који утичу на тубулински цитоскелет, естрамустин фосфата (EP) и паклитаксела (Tax), са циљем да се утврди да ли Tax и EP утичу на TGF- $\beta$  индукцију uPA у RAW 264.7 ћелијама. Резултати MTT и CFSE тестова су показали да само Tax утиче на пролиферацију RAW 264.7 ћелија, иако оба значајно мењају тубулински цитоскелет. Тест „зарастања ране” *in vitro* и миграциони тест са Бојденовом комором су показали да третман Tax и EP смањује капацитет TGF- $\beta$  да покрене ћелијску миграцију. Ову инхибицију ћелијске покретљивости, према резултатима зимографије, прати смањење капацитета TGF- $\beta$  да увећа продукцију uPA у присуству Tax и EP. Осим тога, лекови су снажно инхибирали TGF- $\beta$  сигналну трансдукцију путем Smad3, што је указало да би Tax и EP могли, инхибицијом овог сигналног пута, да остваре свој инхибиторни утицај на експресију uPA чак и у присуству TGF- $\beta$ .

На крају, у **шестом делу**, испитан је утицај дексаметазона (Dex) на продукцију uPA у присуству LPS или TGF- $\beta$ . Интересантан је налаз да Dex дозно-зависно инхибира капацитет RAW 264.7 ћелија да продукују uPA. Такође, истовремени третман Dex и LPS је показао њихово адитивно дејство на продукцију uPA. Осим тога, запажен је адитивни ефекат Dex и LPS и у фосфорилацији p38 молекула, што указује да би инхибиција продукције uPA под дејством Dex могла да се оствари активацијом p38 сигнализације. При истовременом третману Dex и TGF- $\beta$  није уочена промена продукције uPA, што указује да TGF- $\beta$  својим дејством превазилази инхибиторно дејство Dex на продукцију uPA.

Резултати презентовани у овој докторској дисертацији отварају нове могућности за будућа истраживања, посебно на нивоу молекуларних механизма укључених у продукцију uPA у макрофагима.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, резултати су разматрани са више различитих аспеката, неопходних за адекватно разматрање добијених резултата, при чему је кандидаткиња показала добро познавање досадашњих знања о биологији мишићних макрофага и протеаза ванћелијског матрикса, uPA и MMP-9 пореклом од ових ћелија. С обзиром на бројне контраверзне податке који постоје у савременој литератури, а тичу се дате проблематике, кандидаткиња је критички анализирила своје резултате у складу са најновијим литературним подацима. Осим тога, у овом поглављу је изнета

интересантна дискусија која повезује испитане молекуларне механизме који су у основи регулације uPA у присуству LPS и TGF- $\beta$ , односно MMP-9 у присуству TGF- $\beta$ , са подацима из литературе који се односе на регулацију експресије MMP-9 деловањем LPS. Интригантне су могуће последице различите регулације uPA и MMP-9 у присуству LPS и TGF- $\beta$ , ако се има у виду да оба фактора делују на различитим нивоима инфламације – њене активације, односно резолуције. Сугерисан је значај прецизне регулације и uPA и MMP-9 који учествују у реорганизацији ванћелијског матрикса и имају кључну улогу у регенерацији ткива током инфламације. Осим тога, дискутован је утицај анти-туморских лекова на капацитет МФ да продукују uPA у присуству TGF- $\beta$ , фактора који је често прекомерно експримиран у туморима. Регулацијом количине uPA присутне у туморима, ови лекови би могли да имају значајан утицај у лечењу тумора, с обзиром да uPA, осим протеолитичке, има и улогу у подстицању пролиферације туморских ћелија, њиховом преживљавању и метастазирању.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња на јасан начин сумира податке, који произилазе из добијених резултата и одговарају задатим циљевима. Изнето је више појединачних закључака о механизмима којим LPS и TGF- $\beta$  регулишу експресију uPA и MMP-9 у мишјим макрофагима, али и експресији ових протеаза у M1 и M2 макрофагима поларизованим применом LPS и IFN $\gamma$ , односно IL-4. Изведени су и индивидуални закључци о ефектима анти-туморских лекова, EP и Tax, на миграцију макрофага и продукцију uPA током третмана TGF- $\beta$ , као и ефектима Dex на продукцију ове протеазе. На крају, општи закључак указује на значај разумевања краткотрајне и другачије регулације uPA и MMP-9 у макрофагима током инфламације, имајући у виду значај реорганизације ванћелијског матрикса у процесу инфламације.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА**, наведено је 226 одговарајућих библиографских јединица.

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

### **Б1. Радови у часописима међународног значаја (M23)**

1. **Mojsilović SS**, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta differently regulates urokinase type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 expression in mouse macrophages; analysis of intracellular signal transduction. Cell Biology International 39 (2015): 619-28.

## **Мишљење и предлог Комисије:**

Докторска дисертација кандидаткиње мр Соње С. Мојсиловић, под називом „Утицај про- и анти-инфламацијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишјих макрофага“ по својој форми и садржају, добро написаном уводу, јасно дефинисаним циљевима, као и одговарајућем експерименталном дизајну и методологији, из којих су проистекли добро приказани оригинални резултати који су компетентно продискутовани и на основу којих су донесени добро формулисани закључци, испуњава све критеријуме добро написаног научног рада. Посебна вредност ове дисертације је разматрање (експериментално и кроз дискусију) значаја диференцијалне регулације uPA и MMP-9 у светлу значаја

учешћа оба фактора у процесу инфламације, како у индукцији, тако и у њеном завршетку, а и са сапекта важности прецизне регулације ових активности макрофага у реорганизацији ванћелијског матрикса и регенерацији ткива током инфламације. Испитивање утицаја анти-туморских лекова на капацитет МФ да продукују uPA у присуству TGF- $\beta$ , који се често прекомерно експримира у туморима осветљава, крчи пут критичком сагледавању учинка ових лекова у третману тумора, посебно ако се има у виду да uPA, осим протеолитичке, има и улогу у подстицању пролиферације туморских ћелија, њиховом преживљавању и метастазирању.

На основу изложене анализе докторске дисертације, Комисија закључује да су постављени циљеви докторске дисертације успешно реализовани.

Због свега изложеног, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај о урађеној докторској дисертацији мр Соње С. Мојсиловић, под насловом „**Утицај про- и анти-инфламацијских фактора на продукцију протеаза ванћелијског матрикса uPA и MMP9 мишићних макрофага**“, и овај рад узме као основ за јавну одбрану.

---

Др Милена Катарановски, редовни професор и научни саветник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

Др Хуан Франциско Сантибањез Домингез, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

---

Др Драгана Вучевић, научни саветник, редовни професор Медицинског факултета ВМА, Универзитета одбране

У Београду, 29.07.2016. године