

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

На **I** редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној **11.10.2019.** године, на основу молбе ментора, др Гордане Матић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Диане Бугарски, научног саветника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Христине Н. Обрадовић**, истраживача сарадника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду под насловом: „**Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације**“, у саставу:

1. др Диана Бугарски, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања
2. др Гордана Матић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет
3. др Јелена Крстић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Христине Н. Обрадовић под називом: „*Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације*“ својом темом, циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки

допринос разумевању биологије и функционалних карактеристика мезенхимских матичних ћелија изолованих из периферне крви и Вартонове слузи хуманог пупчаника под утицајем фактора специфичних микросредина.

Докторска дисертација је у потпуности урађена у Лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, у оквиру пројекта основних истраживања (ОИ175062) под називом „Регенеративни и модулаторни потенцијал адултних матичних ћелија“ финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација под наведеним насловом је написана на 144 страна и садржи 7 поглавља, 35 слика, 4 табеле, 367 литературних података и 1 прилог. На почетку дисертације приложени су подаци о члановима комисије за одбрану докторске дисертације, резиме на српском и апстракт на енглеском језику са кључним речима (без пагинације) и садржај. Пагинирани текст ове докторске дисертације састоји се од 7 поглавља и то: *Увод* (35 страна), *Циљеви* (3 стране), *Материјал и методе* (24 страна), *Резултати* (39 страна), *Дискусија* (16 страна), *Закључци* (2 стране) и *Литература* (24 страна). На крају дисертације приложена је Листа скраћеница, Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет истраживања докторске дисертације Христине Н. Обрадовић јесте испитивање ефеката специфичних услова микросредине на функционална својства примарних мезенхимских матичних ћелија (ММЋ) и то интерлеукина-17 (*IL-17*) на функционална својства ММЋ изолованих из периферне крви и ниске оксигенације на функционална својства ММЋ изолованих из хуманог пупчаника.

Поглавље **УВОД** је подељено на 2 целине. Кандидаткиња у првом делу описује историјат и развој науке о матичним ћелијама и појам ММЋ. Описани су критеријуми за њихову карактеризацију и наведени су извори из којих се ове ћелије могу изоловати. Дат је осврт на физиолошку улогу и могуће механизме којима ММЋ остварују свој терапијски потенцијал. На крају првог дела детаљно су описане мезенхимске матичне ћелије периферне крви (ПК-ММЋ) и Вартонове слузи хуманог пупчаника (ВС-ММЋ). У другом

делу поглавља кандидаткиња објашњава појам микросредине (нише) матичних ћелија, њен састав, регулацију и динамику. Описана су сазнања о специфичним микросрединама попут инфламаторне и средине ниске оксигенације (хипоксије). У оквиру анализе инфламаторне микросредине објашњени су структура, функција и механизми деловања плејотропног проинфламаторног цитокина *IL-17*. Објашњена је структура фамилије *IL-17* рецептора, као и сигнални путеви активирани овом фамилијом цитокина. Наведени су до сада познати извори овог цитокина и биолошки ефекти *IL-17*, укључујући и досадашња сазнања о деловању овог цитокина на различите функције ММЋ. На крају другог дела уводног поглавља кандидаткиња описује појам хипоксичне микросредине и регулацију ћелијског одговора на ниске концентрације кисеоника. Посебно је описана структура и функција фактора који учествују у регулацији ћелијског одговора на хипоксију, као и начин регулације. Додатно су изнета досадашња сазнања везана за биолошке ефекте хипоксије на ММЋ.

У поглављу **ЦИЉЕВИ** јасно и концизно су изнети и описани основни циљеви истраживања у оквиру ове дисертације који обухватају:

- 1) Изолацију и карактеризацију ММЋ из периферне крви и пупчаника здравих донора.
- 2) Испитивање утицаја и механизма деловања *IL-17* на миграторне функције ММЋ изолованих из периферне крви, укључујући њихову миграцију и мобилизацију, експресију протеолитичких ензима, адхезију за ендотелске ћелије и трансендотелску миграцију.
- 3) Испитивање утицаја и механизма деловања различитих концентрација кисеоника на функције ММЋ изолованих из пупчаника укључујући имунофенотип, пролиферацију, диференцијацију, клоногени капацитет, преживљавање и ћелијски циклус те миграцију и мобилизацију ових ћелија.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани експериментални протоколи за сваки од циљева, као и методе које су коришћене у овом истраживању и начин обраде резултата, а навођени су и реагенси и уређаји који су коришћени у раду. Описане су методе изолације, култивације и карактеризације ММЋ. За анализу специфичних ћелијских функција примењене су следеће методе: за анализу

пролиферације коришћен је *MTT* тест, као и бројање у трипан плавом, док је клоногени капацитет анализиран *CFU-F* тестом, а миграторни процеси *Scratch* тестом, тестом заснованом на *Boyden* комори и тестом мобилизације из колагенских капи. Диференцијација испитиваних ММЋ у правцу остеогене, хондрогене и адипогене лозе индукована је култивацијом у одговарајућим медијумима и одређена хистохемијским бојењем и квантитативном анализом специфичних маркера. Адхезија ММЋ за ендотелске ћелије и подендотел праћена је имунофлуоресцентним обележавањем, а ћелијски циклус и ћелијско преживљавање одређени су проточном цитометријом. Описане су и различите методе за детекцију експресије протеина попут проточне цитометрије, имуноцитохемијског обележавања, зимографије и *Western blot* методе, као методе за анализу експресије гена (*RT-PCR* и *Q-RT-PCR*). Учешће специфичних сигналних путева у деловању испитиваних фактора специфичних микросредине на ММЋ испитивано је детектовањем нивоа активације ових молекула коришћењем *Western blot* методе и применом одговарајућих фармаколошких инхибитора сигналних путева.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња систематично и на детаљан начин представља резултате својих истраживања. Добијени резултати су приказани на 35 слика допуњених пратећим текстуалним објашњењима. У оквиру првог одељка **Изолација, култивација и карактеризација ММЋ**, ММЋ су успешно изоловане из периферне крви и пупчаника и окарактерисане према критеријумима прописаним од стране Међународног друштва за ћелијску терапију у складу са првим постављеним циљем ове дисертације. Испитиване ћелије показују способност адхезије за пластику и испољавају морфологију налик фибробластима. Када је реч о фенотипским маркерима које испољавају испитиване ММЋ, показано је да ове ћелије у високом проценту (преко 90%) експримирају маркере карактеристичне за ММЋ, уз одсуство експресије маркера хематопоетских ћелија, док је анализом на протеинском нивоу потврђено да ММЋ периферне крви и пупчаника експримирају и маркере ембрионалних матичних ћелија, *NANOG*, *SOX-2*, *SSEA-4* и *OCT-4*. Мезенхимске матичне ћелије периферне крви и пупчаника показују способност диференцијације у ћелије остеогене, адипогене и хондрогене лозе.

У одељку **Ефекти микросредине на функционална својства ММЋ** први део истраживања односио се на испитивање утицаја и механизма деловања *IL-17* на миграторна својства ПК-ММЋ. Утврђено је да ПК-ММЋ експримирају рецептор за *IL-17* и

на протеинском и на генском нивоу што указује да овај цитокин делује на испитиване ћелије. Што се тиче ефеката *IL-17* на миграцију ПК-ММЋ, резултати ове докторске дисертације су показали да овај цитокин стимулише миграцију и мобилизацију ПК-ММЋ делујући као хемоатрактант. Резултати добијени испитивањем ефеката *IL-17* на експресију ензима укључених у разградњу компоненти екстраћелијског матрикса, матриксних металопроотеиназа (*MMP*) и урокиназног активатора плазминогена (*uPA*) код ПК-ММЋ показали су да овај цитокин стимулише експресију и активност урокиназе, док нема ефеката на *MMP*. Поред тога, показано је да *uPA* посредује у стимулацији миграције и мобилизације ПК-ММЋ из колагена индуковане интерлеукином-17. Резултати су такође показали да се стимулаторни ефекат *IL-17* на миграцију ПК-ММЋ посредовану урокиназом остварује активацијом *ERK1,2 MAPK* сигналног пута. У оквиру ових експеримената утврђено је да је током ових процеса цитоскелет реорганизован на тај начин да су актинска влакна оријентисана ка загребаној површини, док је *uPA* локализована у ћелијским наставцима. Везано за испитивање ефеката *IL-17* на механизам миграције ПК-ММЋ у циљна ткива под упалом/оштећена ткива, добијени резултати су показали да *IL-17* стимулише адхезију ПК-ММЋ на ендотелске ћелије, као и да повећава последичну трансмиграцију кроз ендотелски слој на начин зависан од активације *uPA*. Такође је утврђено да *IL-17* стимулише адхезију ПК-ММЋ за фибронектин у подендотелском ванћелијском матриксу.

У следећем сегменту истраживања у контексту разумевања ефеката хипоксије на функционалне карактеристике ВС-ММЋ, испитивани су ефекти физиолошке (3%) и „лабораторијске” (21%) концентрације кисеоника. Код ових ћелија при култивацији на 3% O_2 , потврђена је експресија главног регулатора одговора ћелије на концентрације O_2 - *HIF-1 α* на генском и протеинском нивоу. Резултати добијени испитивањем ефеката различитих концентрација O_2 на мезенхимски фенотип ВС-ММЋ показали су да 3% O_2 не мења њихову морфологију и имунофенотип. Такође је утврђено да ВС-ММЋ задржавају диференцијациони потенцијал за ћелије мезодермског порекла на обе концентрације O_2 . Међутим, у резултатима докторске дисертације Христине Обрадовић по први пут је изведена свеобухватна анализа ефеката различитих концентрација O_2 на диференцијациони потенцијал ВС-ММЋ при којој је квантификацијом хистохемијског бојења диференцијације и анализом експресије *iRNK* за диференцијационе маркере

показано да 3% O₂ смањује остеогену, док стимулише адипогену и хондрогену диференцијацију ВС-ММЋ. Резултати су такође потврдили да 3% O₂ стимулише пролиферацију ВС-ММЋ и скраћује време дуплирања ћелијске популације, као и да повећава учесталост колонија сличних фибробластима. Анализом генске експресије маркера ембрионалних матичних ћелија, транскрипционих фактора *OCT4*, *NANOG* и *SOX2*, утврђено је да је култивисање ВС-ММЋ на 3% O₂ значајно повећало њихову експресију те да хипоксија појачава „матичност“ ВС-ММЋ. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су по први пут испитала ефекат различитих концентрација O₂ на ћелијски циклус ВС-ММЋ, и резултати су показали да 3% O₂ не мења значајно њихов ћелијски циклус. Уз то, утврђено је да 3% O₂ штити ВС-ММЋ од апоптозе. Што се тиче испитивања ефеката различитих концентрација O₂ на миграторни капацитет ВС-ММЋ, добијени резултати у оквиру ове дисертације показали су да ВС-ММЋ култивисане на 3% O₂ имају већу способност миграције и мобилизације у односу на ћелије култивисане на 21 % O₂. Резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације су по први пут показали да је прекултивација ВС-ММЋ на 3% O₂ довела до значајног повећања ћелијске миграције. Литературни подаци о учешћу различитих сигналних путева у миграцији ВС-ММЋ су ретки, а резултати добијени у оквиру ове дисертације сугеришу да *ERK1/2 MAPK* није укључена у миграцију ВС-ММЋ, док је њено учешће у мобилизацији ових ћелија из колагена независно од концентрације O₂. Такође, *Wnt/β-catenin* сигнални пут активиран је током миграције и мобилизације ВС-ММЋ у стандардним условима. У оквиру одређивања молекуларних механизма који омогућавају разградњу ванћелијског матрикса током миграције ВС-ММЋ при различитим концентрацијама кисеоника, показано је да 3% O₂ стимулише активност *MMP* и *uPA* код ВС-ММЋ.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња је критички анализирала своје резултате које је на детаљан и свеобухватан начин повезала са резултатима сличних истраживања објављеним у међународним научним часописима. Ово поглавље подељено је на три логичне целине у оквиру којих су поступно тумачени резултати ове докторске дисертације у контексту постојећих литературних података. Такође, резултати истраживања непознати научној литератури и показани по први пут анализирани су и објашњени на одговарајући начин.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно су сумирани закључци изведени на основу добијених и дискутованих резултата а према претходно постављеним конкретним циљевима:

1. ПК-ММЋ и ВС-ММЋ је могуће изоловати методом центрифугирања у градијенту густине односно методом експланта и одржавати у култури;
2. Изоловане ММЋ су окарактерисане на основу способности адхезије за пластику, експресије специфичних површинских мезенхимских маркера и мултипотентног потенцијала диференцијације у остеогену, хондрогену и адипогену лозу. Код изолованих ММЋ потврђена је и експресија ембрионалних маркера/маркера плурипотентности, *NANOG*, *OCT4*, *SOX-2* и *SSEA4*;
3. Испитивања ефеката проинфламаторног цитокина *IL-17* на регулацију миграторних својства ПК-ММЋ показала су да *IL-17* појачава миграцију и мобилизацију ПК-ММЋ посредством *uPA* на начин зависан од активације *ERK1/2 MAPK*;
4. Стимулаторни ефекти које *IL-17* остварује на миграцију ПК-ММЋ праћени су променама у цитосклету ових ћелија, које се огледају у оријентисању Ф-актина и γ -тубулина ка загребаној површини и доводе до поларизације ћелија, али и локализацијом *uPA* у ћелијским протрузијама;
5. *IL-17* позитивно регулише адхезију ПК-ММЋ на ендотелске ћелије делујући на оба типа ћелија, и последично појачава трансендотелску миграцију ПК-ММЋ зависно од активације *uPA*. Активност *uPA* и њена интеракција са ћелијском површином, посредују способности *IL-17* да повећа адхезију ПК-ММЋ за фибронектин подендотелске базалне мембране чиме је обезбеђена ендотелска пропустљивост и инвазија ћелија у циљно ткиво;
6. Култивација ВС-ММЋ у хипоксичним условима на 3% O₂, не утиче на њихов мезенхимски фенотип, али модулише њихов диференцијациони потенцијал. Хипоксични услови стимулишу адипогену и хондрогену, док смањују остеогену диференцијацију ВС-ММЋ;
7. Излагање ВС-ММЋ условима од 3% O₂ побољшава њихову „матичност“ у смислу повећања експресије ембрионалних маркера *NANOG*, *OCT4*, *SOX-2* као и пролиферативног и клоногеног потенцијала ћелија. У условима ниске оксигенације, квалитет ових ћелија је очуван с обзиром да 3% O₂ доводи само до транзијентне промене у ћелијском циклусу и штити од апоптозе;

8. Миграторни капацитет ВС-ММЋ, као и активност протеолитичких ензима повећани су у испитиваним хипоксичним условима од 3% O₂. Међутим, смањена оксигенација нема утицаја на активацију специфичних сигналних путева у овим процесима, с обзиром да *ERK1/2* *MAPK* посредује мобилизацији ВС-ММЋ из колагена независно од концентрације O₂, док се *Wnt/β-catenin* пут активира током миграције и мобилизације у стандардним условима. Поред тога, активност *uPA* код ВС-ММЋ посредована је активацијом оба сигнална пута, али такође на начин независан од концентрације O₂.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** дата је опсежна листа научних публикација које су у складу са областима које су од значаја за урађену докторску дисертацију и адекватно и на одговарајућим местима су цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Obradovic H**, Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, Okic I, Kukolj T, Ilic V, Jaukovic A, Terzic M, Bugarski D. Improving stemness and functional features of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of a human umbilical cord by mimicking the native, low oxygen stem cell niche. *Placenta*. 2019;82:25-34. (M21)

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.05.005>

2. Krstić J*, **Obradović H***, Jauković A, Okić-Đorđević I, Trivanović D, Kukolj T, Mojsilović S, Ilić V, Santibañez JF, Bugarski D. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(2):431-44. (M21)

*аутори су подједнако допринели раду

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.025>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Krstić J, **Obradović H**, Jauković A , Okić Đorđević I, Trivanović D, Kukulj T, Mojsilović S ,Ilić V, Santibanez JF, Bugarski D. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin17 induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. 10th ENII EFIS EJI summer school on advanced immunology, Sardinia, Italy, 12-19. May, 2015. Abstract book, pp 112 **(M34)**
2. **Hristina Obradović**, Jelena Krstić, Drenka Trivanović, Slavko Mojsilović, Juan F. Santibanez, Ivana Okić-Đorđević, Tamara Kukulj, Vesna Ilić, Aleksandra Jaukovic, Diana Bugarski. Improving stemness and functional features of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of a human umbilical cord by mimicking the native, low oxygen stem cell niche. CellFit Workshop- Cells Communicate! Belgrade, Serbia, 13-14. March, 2019. Book of Abstracts of the 2nd CellFit Workshop, p83-84. **(M34)**

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације**“, аутора Христине Н. Обрадовић, констатовано је да утврђено подударање текста износи 25%. Овај степен подударности претежно је последица подударања имена аутора, наслова радова и других библиографских података о коришћеној литератури; пуних назива и општеприхваћених симбола којим се означавају гени, протеини, биолошки активни молекули и ћелије; назива коришћених метода и апарата; појединих детаља експерименталних процедура, као што су дужине и температуре инхибирања, медијуми и услови култивација и сл.; коришћених стандардних израза из области истраживања и/или кратких фраза уобичајених унашем језику, као што је „Резултати су показали да“, „У складу са претходним истраживањима“, „Статистички значајне разлике“ и сл. Сматрамо да су све пронађене подударности прихватљиве и да ни на који начин не утичу на оригиналност ове докторске дисертације Христине Н. Обрадовић.

Мишљење и предлог Комисије

На основу прегледа докторске дисертације Христине Н. Обрадовић под насловом *„Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације“* Комисија је мишљења да овај рад представља оригиналан и значајан научни допринос кандидаткиње у области молекуларне биологије ћелије и биологије матичних ћелија. По свом садржају и форми, добро написаном уводном делу, јасно постављеним истраживачким циљевима, добро осмишљеној методологији, прецизно изнетим резултатима рада, разложној дискусији и добро формулисаним закључцима ова докторска дисертација испуњава све критеријуме добро написаног научног рада.

Свеобухватна истраживања ефеката и механизма деловања П-17 на миграторне функције мезенхимских матичних ћелија периферне крви, као и ефеката ниске оксигенације на различите функције мезенхимских матичних ћелија хуманог пупчаника приказана у докторској дисертацији Христине Н. Обрадовић допринела су разумевању биологије мезенхимских матичних ћелија у специфичним микросрединама. Добијени резултати истичу комплексност биологије мезенхимских матичних ћелија и њихових интеракција са факторима из окружења. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

На основу свега изложеног, као и чињенице да је кандидаткиња Христина Н. Обрадовић испунила све формалне услове за одбрану докторске дисертације под насловом *„Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у*

проинфламаторним и условима измењене оксигенације“, Комисија има задовољство да предлажи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да усвоји извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Христине Н. Обрадовић.

КОМИСИЈА:

др Диана Бугарски, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

др Гордана Матић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Јелена Крстић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

У Београду, 17.10.2019.