

## НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Наставно-научног већа Медицинског факултета у Београду, одржаној дана 03.04.2024. године, број 19/XXIII-4/3-СМ, именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом: „Механизми интеракција мезенхималних матичних ћелија и макрофага у регулацији стрес еритроцитопоезе“ кандидаткиње др мед. Сање Момчиловић, запослене на Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду. Ментор проф. др Андрија Богдановић и коментор научни сарадник др Сања Вигњевић Петриновић.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Проф. др Марија Пљеша Ерцеговац, Медицинска биохемија, Медицински факултет Универзитета у Београду
2. Доц. др Данијела Лековић, Интерна медицина, Хематологија, Медицински факултет Универзитета у Београду
3. Проф. др Марија Вукелић-Николић, Генетика, Медицински факултет Универзитета у Нишу

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 "Механизми интеракција мезенхималних матичних ћелија и макрофага у регулацији стрес еритроцитопоезе" написана је на 91 страна и подељена је у седам поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Дисертација садржи 41 слику, 3 табеле и 342 литературних цитата.

**УВОД** се састоји из 5 целина и илустрован је са 6 слика. Први део увода почиње прегледом литературе везане за процес еритроцитопоезе и наставља се описом регулације продукције еритроцита у базалним условима, са посебним освртом на стања повећаних потреба

организма за еритроцитима - процес означен као стрес еритроцитопоеза. Други део увода посвећен је макрофагима и њиховој улози у процесу еритроцитопоезе и стрес еритроцитопоезе. Трећи део увода описује мезенхималне матичне ћелије (MSC), њихов значај у процесу хематопоезе и међусобној интеракцији са макрофагима. У четвртом делу увода описује се улога сигналног молекула азот монооксида (NO) у регулацији еритроцитопоезе, функцији макрофага и MSC. У петом делу увода описан је пуринергички сигнални систем и ванћелијски нуклеотид, њихова улога у регулацији еритроцитопоезе, функцији макрофага и мезенхималних матичних ћелија.

**ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** су јасно дефинисани и усмерени на расветљавање интеракција мезенхималних матичних ћелија и макрофага током регулације стрес еритроцитопоезе, а обухватају: испитивање утицаја деплеције макрофага на процес еритроцитопоезе током хроничног стреса, утицај деплеције макрофага на карактеристике и потенцијал диференцијације MSC изолованих из коштане сржи и слезине хронично стресираних мишева, улогу азот монооксида у интеракцијама макрофага и MSC изолованих из коштане сржи и слезине миша, као и испитивање улоге ванћелијских нуклеотида и пуринергичног сигналног система у интеракцијама макрофага са MSC изолованим из коштане сржи и слезине миша.

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 тзв. *restraint* стрес који подразумева делимичну имобилизацију животиње, а деплеција макрофага постигнута је интраперитонеалним давањем клодронат липозома више пута у току експеримента. Ефекат стреса у ћелијским културама и ко-културама имитиран је додавањем котрикостерона и еритропоетина у дозама које се одговарале циркулишућим концентрацијама ових хормона, претходно добијеним у мишјем моделу стрес еритроцитопоезе. Механизми интеракција макрофага и MSC у регулацији процеса еритроцитопоезе анализирани су применом различитих метода које су обухватиле: културу ћелија, проточну цитометрију, Грисову реакцију, луминометрију, колориметрију, течну хроматографију високе перформансе и масену спектрометрију, *Western blot*, и квантитативни RT-PCR. Статистичка обрада резултата урађена је једнофакторском анализом варијансе уз примену одговарајућих *post hoc* тестова. За анализу података, добијених PCR методом, примењен је REST програм.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** подељено је у 4 целине, написано је јасно и систематично, у складу са постављеним циљевима, садржи једну табелу и илустровасно је са 35 слика.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња је свеобухватно и аналитично објаснила добијене резултате и повезала их са подацима из литературе. Кандидаткиња разматра улогу макрофага и значај интеракције макрофага и MSC у еритроцитопези која се одвија у условима хроничног психолошког стреса, као и улогу NO, ванћелиских нуклеотида и пуринергичку сигнализацију као главне регулаторе овог процеса. Оригинални резултати докторске дисертације који јасно указују на кључну улогу макрофага и значајан допринос њихових интеракција са MSC у регулацији процеса стрес еритроцитопезе, као и постојање ткивно-специфичне интеракције између макрофага и MSC које су посредоване сигнаlima пуринергичког сигналног система и NO у условима стрес еритроцитопезе, објашњени су на одговарајући начин.

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

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** наведено је 342 библиографских јединица, које се односе се на области значајне за дисертацију, и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

## **Б. Провера оригиналности докторске дисертације**

Коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности ове докторске дисертације. Извештај од 19.01.2024. године је показао индекс подударности од 16%. Увидом у Извештај утврђено је подударање са 162 извора, међутим само су два подударања била 4% и 2% док су сви остали били  $\leq 1\%$  и у садржају без икаквог значаја. Детаљно су анализирана наведена подударања и показало се да највећи проценат подударања проистиче из табеле 4.1, која се односи на објављене резултате ове докторске дисертације, у оквиру рада Момчиловић и сар. 2023 (J Mol Sci 2023;24(14):11373. doi: 10.3390/ijms241411373), а рад је доступан и на репозиторијуму Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду. За остала подударања се показало да су у питању делови текста који се односе афилијације ментора, чланова комисије, на стандардно присутне делове докторских дисертација, у називима поглавља, навођењу стручних термина и општих фраза уобичајених у методолошким описима, скраћеница општег типа специфичних за предмет докторске дисертације, скраћеница везане за статистичке параметре, затим опште делове текста у материјалу и методама, реагенсима примењеним у истраживању, изолацији билошког

материјала, типова ћелија и ткива у самом експерименту као и сојева животиња које су употребљене у истраживању. Ова опажене подударности се повезују са две друге докторске дисертације урађене у оквиру исте истраживачке групе (докторска дисертација коментора др Сање Вигњевић Петриновић, и дисертација др Славка Мојсиловића) где дисертација Сање Момчиловић представља наставак истраживања у оквиру више истраживачких пројеката.

### **Ц. Кратак опис постигнутих резултата**

У првом делу поглавља најпре су приказани резултати који показују да примена клодронат-липозома доводи до значајног смањења броја макрофага у коштаног сржи и слезини. Даље су презентовани резултати утицаја хроничног психолошког стреса и деплеције макрофага на хематолошке параметре, еритроидне прекурсоре и експресију молекула за које се зна да имају улогу током стрес еритроцитопоезе. Резултати су показали да хронични психолошки стрес доводи до смањеног броја еритроцита и нивоа хемоглобина у крви, а деплеција макрофага узрокује њихово додатно смањење. Значајно повећан број CFU-E и BFU-E ћелија у коштаног сржи узроковао је хронични психолошки стрес, док је деплеција макрофага супримирао овај ефекат стреса. Применом проточне цитометрије анализирани су еритроидни прекурсори на основу експресије маркера CD71 и Ter119. Резултати су показали да је деплеција макрофага превенирала ефекат стреса на CD71+/Ter119+, CD71-/Ter119+ ћелије у коштаног сржи, и на CD71+/Ter119+ ћелије у слезини. Даље је, такође, коришћењем проточне цитометрије вршена анализа Ter119 позитивних ћелија на основу њихове величине и резултати су показали да је деплеција макрофага спречила стресом-изазвано повећање броја еритроидних прекурсора у оквиру E1 и E2 субпопулације у коштаног сржи, као и повећање броја E1, E2 и E3 ћелија у слезини. Хронични психолошки стрес довео је до повећане експресије молекула коштаног морфогенетског протеина 4 (BMP4), моноцитног хемоатрактантног протеина 1 (MCP-1) и транскрипционог фактора TLX1 у слезини, док одсуство макрофага није значајно утицало на ово стресом-индуковано повећање.

У другом делу поглавља приказани су резултати испитивања утицаја деплеције макрофага на карактеристике и потенцијал диференцијације MSC изолованих из коштаног сржи и слезине у условима хроничног психолошког стреса. Показано је да ћелије коштаног сржи и слезине, које су се издвојиле на основу способности адхерирања за пластику, експримирају маркере

карактеристичне за MSC миша, односно да експримирају виментин, фибронектин, CD105, CD29 и  $\alpha$ -SMA, док су истовремено показале одсуство експресије CD45 молекула. Резултати су даље показали да су ови маркери били значајно повећани на ћелијама коштане сржи животиња које су биле изложене хроничном психолошком стресу и примиле клодронат-липозом, у односу на ћелије коштане сржи изоловане из контролних животиња и животиња које су биле изложене само *restraint* стресу. За разлику од MSC из коштане сржи, MSC изоловане из слезине животиња које биле изложене деплецији макрофага и хроничном стресу, имале су само повећану експресију iRNK за виментин,  $\alpha$ SMA и CD105, у односу на MSC из слезине мишева који су били изложени само *restraint* стресу и контролних животиња, док је експресија iRNK за фибронектин била повећана само у односу на експресију овог гена код MSC из слезин контролних животиња. Такође, резултати су показали да хронични психолошки стрес доводи до смањене способности адипогене и остеогене диференцијације MSC из коштане сржи. Деплеција макрофага не утиче на адипогену диференцијацију ових ћелија током стреса, али спречава стресом-индуковано смањење остеогеног потенцијала MSC. Поред наведеног, приказани су и резултати који показују да хронични психолошки стрес значајно повећава клоногени потенцијал MSC из коштане сржи и слезине, а деплеција макрофага супримира овај ефекат стреса само на MSC из коштане сржи.

У трећем делу поглавља описани су резултати који указују на ткивно специфичну улогу макрофага у регулацији локалне продукције NO током хроничног психолошког стреса. На основу мерења продукције нитрата и нитрита у ћелиском супернатанту коштане сржи и слезине поаказано је да хронични психолошки стрес узрокује смањену продукцију NO, а третман клодронат-липозомима додатно смањује стресом-изазвано смањење NO у коштане сржи. У слезини, ни *restraint* стрес ни деплеција макрофага нису значано утицали на производњу NO. Даља истраживања су била усмерена на испитивање доприноса макрофага локалној продукцији ванћелијских нуклеотида, а резултати су показали да излагање *restraint* стресу повећава нивое ванћелијског ATP-а у коштане сржи и слезини и да деплеција макрофага доводи до значајног смањења стресом-изазваног повећања ATP-а у коштане сржи и слезини. Применом qRT-PCR-а паказано је да третман клодронат-липозомима спречава стресом-изазвану усходну регулацију експресије рецептора P2X7 и молекула CD39 у коштане сржи и слезини. С друге стране, експресија молекула CD73 је остала непромењена. Деплеција макрофага је такође превенирала стресом-изазвану повећану експресију гена за аденозински рецептор ADORA2A, док није утицала на повећану експресију гена за ADORA2B у стресу.

Анализом експресије ензима укључених у синтезу NO резултати су показали да хронични психолошки стрес доводи до повећане експресије iRNK за eNOS, да третман клодронат-липозомом у базалним условима смањује експресију гена за iNOS и повећава експресију гена eNOS. Колориметриском детекцијом неорганског фосфата одређена је активност ензима CD39 и CD73, а резултати су показали да хронични психолошки стрес доводи до повећане активности ензима CD39, али не и ензима CD73 у коштаном сржи. Деплеција макрофага спречава стресом узроковану повећану активност ензима CD39 и повећава активност ензима CD73 у базалним условима.

У четвртом делу поглавља приказани су резултати добијени испитавањем улоге NO, пуринергичког сигналног система и ванћелиских нуклеотида у интеракцијама макрофага и MSC изолованих из коштане сржи и слезине у *in vitro* моделу. Показано је да третман кортикостероидима и еритропетином, као главним медијаторима стрес еритроцитопоезе, доводи до повећане производње ATP-а у ко-културама MSC из коштане сржи и RAW264.7 ћелија, док блокада NOS-а поништава ефекат стреса на продукцију ATP-а и доводи до повећане експресије гена за CD73. С друге стране, у ко-култури MSC слезине са RAW264.7 ћелијама медијатори стрес еритроцитопоезе тек уз блокаду NOS-а доводе до повећаног ослобађања ATP-а. Третман медијаторима стрес еритроцитопоезе изазвао је смањену концентрацију аденозина у ко-култури MSC коштане сржи/слезине и RAW264.7 ћелија, а блокада NOS-а није утицала на ово смањење. Инхибиција ензимске активности CD73 у ко-културама третираним кортикостероном и еритропетином је додатно редуковала смањену производњу NO и значајно је утицала на експресију NOS ензима.

#### **Д. Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе**

Резултати докторске дисертације су претежно оригинални, те се не могу директно поредити са подацима из литературе. Резултати су показали значајно нижи број еритроцита и нивое хемоглобина код мишева који су третирано клодронат-липозомом и подвргнути рестраинт стресу у поређењу са мишевима који су били изложени само *restraint* стресу, што сугерише да недостатак макрофага значајно погоршава анемију у условима хроничног стреса. Ово је у складу са резултатима Ramos и сар. (2013) који су доказали смањену концентрацију хемоглобина и број еритроцита у циркулацији мишева третираних клодронат липозомом 7

дана након анамије изазване флеботомијом. Резултати истраживачке групе кандидаткиње указали су на повећан број BFU-E и CFU-E ћелија у условима хроничног психолошког стреса (Vignjević и сар., 2014), али улога макрофага, као ћелија које чине централну компоненту еритропоетске нише, током овог процеса претходноније испитивана. Резултати ове докторске дисертације су показали да је третман клодронат-липозомима у потпуности спречио стресом-индуковано повећање броја BFU-E и CFU-E ћелија у коштаном сржи и слезини, што сугерише да макрофаги представљају кључне регулаторе и главни извор локално произведених сигнала одговорних за убрзану пролиферацију еритроидних прогенитора током поновљеног психолошког стреса. Слично томе, хемијска аблација макрофага је превенирала повећану пролиферацију BFU-E ћелија слезине у моделу стрес еритроцитопоезе код полицитемије вере (Chow и сар., 2013), као и у стрес еритроцитопоези изазваној тумором (Liu и сар., 2015). У истраживањима која су предмет ове дисертације, одсуство макрофага је потпуно поништило стресом-изазван повећан проценат најнезрелијих еритроидних прекурсора у оквиру E1 субпопулације, док је преокренуло стресом изазвано смањење у проценту зрелијих прекурсорних ћелија коштане сржи (E2), као и стресом смањен проценат најзрелијих прекурсорних ћелија слезине (E3), указујући на значајан допринос макрофага у добијеним променама током сазревања еритроидних прекурсора у условима стреса. Сходно томе, Ramos и сар. (2013) су показали да макрофаги директно стимулишу пролиферацију и ограничавају енуклеацију људских примарних еритробласта изолованих из крви од пацијената са патолошким стрес еритроцитопоезом у  $\beta$ -таласемији. Имајући у виду молекула BMP-4 као кључни сигнал за иницијацију стрес еритроцитопоезе у хроничном стресу (Vignjević и сар., 2014), у склопу ове дисертације је први пут показано да у условима хроничног психолошког стреса, без обзира на одсуство макрофага, експресија овог молекула остаје повећана. Резултати су, по први пут, показали и да хронични психолошки стрес доводи до повећане експресије MCP1 молекула у слезини, као и да одсуство макрофага не утиче на стресом изазвано повећање. Претходно је доказано да се у условима нарушене хомеостазе TLX1 повећано експримира у MSC слезине (Oda и сар., 2018), а резултати ове докторске дисертације су први указуали на значај овог транскрипционог фактора током стрес еритроцитопоезе која је индукована хроничним деловањем психолошког стресора.

Сагласно чињеници да MSC имају способност модулације имунског одговор и да испољавају антиинфламаторне ефекте у специфичној микросредини посредством интеракције са другим ћелијама (Meirelles и сар., 2009), укључујући моноците и макрофаге, и да с друге

стране, макрофаги имају способност регулације MSC (Lu D и сар., 2021), у склопу ове докторске дисертације по први пут су приказани резултати да хронични психолошки стрес повећава клоногени потенцијал MSC у коштаног сржи и слезини, смањује њихов потенцијал за диференцијалцију у остеобласте и адипоците, и да макрофаги, у зависности од ткивно-специфичног микроокружења, дају кључан допринос регулацији клоногеног потенцијала и способности диференцијације MSC. Наведена истраживања су у складу са истраживањима Yu и сар. (2016) и Xia Y. и сар. (2020) која указују на значајан утицај макрофага на пролиферацију, миграцију и преживљавање MSC.

Даља истраживања су се односила на испитивање улога NO, пуринергичког сигналног система и ванћелијских у интракцијама MSC и макрофага током стрес еритроцитопоезе. Резултати ове докторске дисертације показују смањењу продукцију NO под утицајем хроничног стреса, што је у сагласности са резултатима Eskiosak и сар. (2006) и Gądek-Michalska и сар. (2012), који су истраживали промене у продукцији NO током стреса, премда нису детаљно разматрали локалну продукцију NO у коштаног сржи као у овој студији. Утврђено је да деплеција макрофага поништава ефекте стреса на продукцију NO, истичући кључну улогу макрофага, и надограђујући сазнања из студије Wang и сар. (2017), која сугерише утицај глукокортикоида на различите ћелије у микросредини коштане сржи, али без директног повезивања са макрофазима. За разлику од података у литератури (Madrigal и сар., 2001; Kumar и Chanana, 2017) који се односе на промене у експресији iNOS-а током акутног стреса, резултати ове докторске дисертације су показали промену у експресији eNOS-а током хроничног стреса, указујући на потенцијалну специфичност хроничног стреса у индуковању експресије eNOS-а, без утицаја на pNOS и iNOS, као и на различите механизме одговора на акутни и хронични стрес. Резултати претходних истраживања су указали на могућност интеракције ATP и NO у различитим микросрединама (De Deus и сар., 2018), а резултати ове дисертације први пут показују ткивно-специфичност и комплексност њихове интеракције у условима стрес еритроцитопоезе. Кандидаткиња је свеобухватном анализом добијене резултате упоредила са постојећим подацима из литературе, потврђујући значајну улогу ванћелијских нуклеотида у процесу хематопоезе (Ratajczak и сар., 2018) и указала на допринос њених истраживања у разумевању улоге пуринергичког сигналног система у локалном, ткивно-специфичном одговору на стрес, пружајући потенцијалне нове смернице за истраживање и терапију.



## **E. Објављени радови који чине део докторске дисертације:**

**Momčilović S**, Bogdanović A, Milošević MS, Mojsilović S, Marković DC, Kočović DM, Vignjević Petrinović S. Macrophages Provide Essential Support for Erythropoiesis, and Extracellular ATP Contributes to a Erythropoiesis-Supportive Microenvironment during Repeated Psychological Stress. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(14):11373. M21, IF 6.2

**Momčilović S**, Vignjević Petrinović S, Bogdanović A. Molekularni mehanizmi regulacije eritrocitopoeze i stres eritrocitopoeze. *Medicinski podmladak* 2024; 75(6).

## **Ф. Закључак (образложење научног доприноса)**

Резултати докторске дисертације др мед. Сање Момчиловић представљају оригиналан, актуелан и значајан научни допринос дефинисању улоге макрофага и њихових интеракција са MSC у регулацији процеса стрес еритроцитопоезе. У саставу ове докторске дисертације по први пут је показана улога NO и пуринергичног сигналног система у комуникацији макрофага са MSC у условима повишених концентрација глукокортикоида и еритропоетина. Разумевање улоге ових сигналних молекула у наведеним интеракцијама значајно је не само за расветљавање механизма који регулишу убрзану пролиферацију и диференцијацију незрих ћелија еритроидне лозе током процеса стрес еритроцитопоезе, већ може допринети и развоју нових и потенцијално ефикаснијих модалитета лечења анемије.

### **Предлог комисије за оцену завршене докторске дисертације**

Докторска дисертација под називом „Механизми интеракција мезенхималних матичних ћелија и макрофага у регулацији стрес еритроцитопоезе“, кандидаткиње др мед. Сање Момчиловић, 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 великим задовољством предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати завршену докторску дисертацију под називом: „Механизми интеракција мезенхималних матичних ћелија и макрофага у регулацији стрес еритроцитопоезе“, кандидаткиње др мед. Сање Момчиловић и одобри јавну одбрану.

#### **Ментор:**

---

Проф. др Андрија Богдановић

#### **Коментор:**

---

Др Сања Вигњевић Петриновић,  
научни сарадник

#### **Чланови Комисије**

---

Проф. др Марија Пљеша Ерцеговац

---

Доц. др Данијела Лековић

---

Проф. др Марија Вукелић-Николић

Београд, 09.04.2024. године