

ВЕЋУ ЗА СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ У БЕОГРАДУ

## РЕФЕРАТ

### О ЗАВРШЕНОЈ ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ КАНДИДАТКИЊЕ ИРЕНЕ Д. МИЛЕР

Веће за студије при Универзитету у Београду, на седници одржаној 08.07.2024. године именovalo нас је у комисију за преглед и оцену докторске дисертације под насловом „**Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода**“, кандидаткиње Ирене Д. Милер (мултидисциплинарне докторске студије при Универзитету, студијски програм: Биофотоника). Након прегледа и анализе приложене докторске дисертације, подносимо Већу следећи извештај:

#### Основни подаци о кандидату

Ирена Милер је рођена 10. септембра 1990. године у Београду, где је стекла основно и средњешколско образовање. Основне и мастер студије на Биолошком факултету у Београду, модул Биологија, мастер Професор биологије је завршила 2017. године. Одмах по завршетку мастер студија, уписује мултидисциплинарне докторске студије при Универзитету у Београду, програм Биофотоника. У периоду од јуна 2019. године до новембра 2020. године радила је као истраживач приправник у Одељењу за имунохемију и гликобиологију, Института за примену нуклеарне енергије (ИНЕП) у Београду. Од новембра 2020. до јануара 2022. године је била запослена у Лабораторији за атомску физику - Института за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију. Тренутно ради као истраживач сарадник Центра за биосистеме, на Институту Биосенс у Новом Саду. Као резултат рада на докторској дисертацији публикована су два рада у међународним часописима категорије M21 и M22. Први публикован рад је уједно и први рад објављен на програму Биофотоника 2020. године. Коаутор је још једне научне публикације часописа на SCI листи, и аутор и коаутор је више саопштења на скуповима од међународног и националног значаја.

**Библиографија кандидаткиње** обухвата следеће научне радове и конгресна саопштења из докторске дисертације:

#### Научни радови из докторске дисертације (M20):

- **Miler, I, Rabasovic, MD, Aleksic, M, Krmpot, AJ, Kalezic, A, Jankovic, A, Korac, B and Korac, A.** Polarization resolved SHG imaging as a fast screening method for collagen

alterations during aging: Comparison with light and electron microscopy. *J. Biophotonics*. 2021; 14:e202000362. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000362>

**(M21)**

- **Miler, I**, Rabasovic, MD, Askrabic, S, Stylianou, A, Korac, B and Korac A. Short-Term L-arginine Treatment Mitigates Early Damage of Dermal Collagen Induced by Diabetes. *Bioengineering*. 2024; 11(4):407. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11040407>

**(M22)**

**Саопштења са међународних скупова штампана у изводу из дисертације (M34)**

- **Irena Miler**, Mihailo Rabasovic, Marija Aleksic, Igor Golic, Aleksandar Krmpot, Aleksandra Jankovic, Bato Korac, Aleksandra Korac. „Biophotonic properties of rat skin dermis during chronological aging“, IONS' BARCELONA 2019, Barcelona, Spain, June 2019, p. 70. **(GRANT)**
- **Miler I**, Rabasovic MD, Askrabic S, Korac B, Korac A. Correlative collagen imaging in experimental diabetes. 10th International Conference on Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine, Andros, Greece, 15-18 September 2022, p. 86.

**Предмет и циљеви докторске дисертације**

**Предмет** ове докторске дисертације је испитивање понашања колагена I у дермису пацова на свим хијерархијским нивоима његове грађе, како у физиолошким (старење) тако и у патолошким условима (дијабетес типа 1) применом различитих конвенционалних и напредних микроскопских, као и спектроскопских метода. Са идејом да се разуме утицај, предвиди и побољша стање колагена у датим условима, дисертација је подељена на три главне целине чији се закључци међусобно употпуњују.

Прва целина дисертације се фокусира на ефекте кумулативног оксидативног стреса на дермис коже пацова током процеса хронолошког старења. Коришћењем модалитета нелинеарне ласерске скенирајуће микроскопије (енг. Nonlinear laser scanning microscopy, NLSM) попут поларизације другог хармоника (енг. Polarizations resolved second harmonic generation, PSHG) и двофотонске ексцитоване флуоресценције (енг. Two photon excited fluorescence, TPEF), анализиране су промене у колагену на парафинским пресецима коже пацова различитих старосних група. PSHG је изабран као брз и поуздан скрининг метод за истраживање промена у структури колагена у контексту хронолошког старења, које су узроковане оксидативним стресом. Суптилне промене које утичу на структуру молекула колагена анализиране су првом хиперполаризацијом или  $\beta$  коефицијентом, рачунатим са PSHG



слика.  $\beta$  је кодиран бојом, и интензитет представља интензитет SHG сигнала у датом пикселу према просечној вредности две слике снимљене кроз анализатор, оријентисане паралелно и нормално на упадну поларизацију ласера. Гранични случај, када је  $\beta$  једнак 1, одговара потпуном поравнању фибриларног колагена. Коришћењем напредних метода микроскопије на фиксираним узорцима, у комбинацији са конвенционалним методама, деградација узорака је спречена, репродуктивност резултата је доследна и протокол је стандардизован. Укључивање оба типа микроскопских техника омогућило је детаљно испитивање структурних промена у колагену на различитим хијерерхијском нивоима, што је од кључног значаја за добијање целокупне слике о процесима који утичу на старење коже.

Друга целина докторске дисертације се бави изазовима у разумевању структуре колагена I у физиолошким условима и уводи L-аргинин као регулатор ремоделовања коже. Аминокиселина L-аргинин може да послужи као прекурсор синтезе колагена путем пролинског пута. Истовремено, L-аргинин је супстрат за синтезу азот-мооксида (NO) и стога је укључен у многе важне регулаторне механизме у дермису коже. NO је посредник у зарастању рана кроз индукцију синтезе колагена, инхибицију матриксних металопроотеиназа, као што је MMP9, и тиме деградацију колагена. Кроз мултидисциплинарни приступ који укључује микро-Раманову спектроскопију, NLSM и електронску микроскопију, студија се бави истраживањем ремоделовања колагена I у кожи пацова након дуготрајног третмана L-аргинином (45 дана).

Трећа целина докторске дисертације се бави истраживањем структурних промена колагена I у дермису дијабетичних пацова и након краткорочног третмана L-аргинином, користећи претходно установљени мултимодални приступ употпуњен микроскопијом на бази атомских сила. Из литературе се може сазнати да промене у наноморфологији и механичким својствима колагених фибрила, које доприносе патолошком стању коже код дијабетеса, могу бити резултат накупљања унакрсно повезаних колагених нанофрагмената.

Ова истраживања имају потенцијал да обогате разумевање молекулских основа структурних промена у колагену и да допринесу развоју нових терапија и превентивних мера за одржавање здравља и еластичности коже у различитим условима. Такође отварају пут ка практичним применама стечених сазнања у регенеративној и *anti-aging* медицини.

Ова дисертација имала је као основни **циљ** да истражи структурне промене у дермису коже пацова, фокусирајући се на молекулски основ измена у колагену током различитих услова: физиолошког старења и патолошких промена, као што је дијабетес типа 1. Коришћењем напредних микроскопских техника у корелацији са конвенционалним, добила би се детаљна слика структурних измена у колагену и његовим молекулским компонентама.

Појединачни циљеви истраживања су дефинисани кроз три модела:

1. Хронолошко старење: Испитивање како се молекул колагена, колагенски фибрили и влакна мењају у дермису коже пацова током процеса старења. Ово је од значаја за разумевање молекуларних основа природних процеса старења коже.
2. Ефекат L-аргинина на ремоделирање колагена: Испитивање како дуготрајни третман L-аргинином утиче на структурне промене у колагену, колагеним фибрилама и влакнима у дермису пацова. Ово може пружити увид и дати основу за потенцијалну терапијску примену L-аргинина у третманима коже.
3. Ефекат L-аргинина на промене у дијабетесу типа 1: Испитивање како краткотрајни третман L-аргинином може утицати на структурне промене у колагену, фибрилама и влакнима у дермису пацова којима је експериментално изазван дијабетес типа 1. Овај модел истраживања је од значаја за истраживање потенцијалних терапија које би могле ублажити или спречити промене настале као последица дијабетеса типа 1.

**Кратак опис садржаја докторске дисертације**

Докторска дисертација под насловом „Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“ написана је на српском језику на **61 страни** рачунајући текст дисертације. Дисертација је структурирана кроз следећа поглавља: **Увод** (стр. 1-10), **Циљеви истраживања** (стр. 11), **Материјал и методе** (12-19), **Резултати** (20-39), **Дискусија** (40-48), **Закључци** (49-50) и **Литература** (51-61, укупно **129** библиографских јединица наведених по абecedном реду). Дисертација садржи **23** слике и **схему** (четири слике у поглављу Увод, једну схему и једну слику у поглављу Материјал и методи и 18 слика у поглављу Резултати) и **две табеле** (обе табеле у поглављу Резултати). Дисертација има укупно **74 стране** рачунајући уобичајене уводне и завршне елементе са неопходним информацијама о докторској дисертацији: Насловну страну на српском, Насловну страну на енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Страну са изјавама захвалности, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику и Садржај. На крају докторске дисертације се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

**Увод** се састоји из пет главних поглавља и два потпоглавља у којима је дат преглед досадашњих сазнања из литературе која се тичу проблематике којом се бави докторска дисертација. На почетку уводног поглавља је дата хистолошка и цитолошка организација коже сисара. У првом потпоглављу су описани фибробласти, ћелије дермиса које синтетишу компоненте ванћелијског матрикса, које даље уводи у друго потпоглавље које се бави синтезом и значајем колагена као његове



најважније компоненте. У уводу је такође кратко и јасно објашњено зашто је кожа пацова узета као модел за проучавање колагена. Даље, поглавља су подељена на три целине, у оквиру којих су јасно изнети аргументи и разлози за избор модела на основу којих ће се решавати проблематика докторске дисертације. Први модел се бави структурним променама колагена током хронолошког старења. У оквиру тог дела дат је општи преглед нелинеарне оптичке микроскопије са посебним освртом на њене јединствене предности. Други модел уводи третман L-аргинином ради праћења структурних промена колагена и дат је кратак опис мултимодалне анализе којом су промене праћене и детектоване. Трећи модел ставља акценат на патолошке промене коже изазване дијабетесом и истиче потенцијални терапијски значај L-аргинина. У оквиру овог поглавља такође је дат сиже мултимодалности метода.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања**, дефинисан је главни циљ и у оквиру главног циља јасно су дефинисана три подциља кроз три модела.

У поглављу **Материјал и методи** кандидаткиња описује све примењене протоколе и истраживачке методе коришћене у извођењу експеримената у оквиру ове докторске дисертације. Поглавље је такође подељено у потпоглавља у складу са датим моделима, и у оквиру сваког модела је јасно описана методологија рада. На почетку описа модела су наведени протоколи за припрему узорка за осликавање а затим су описане различите експерименталне и инструменталне поставке. Кандидаткиња је детаљно описала инструменталну поставку за NLSM и параметре снимања, начин осликавања и анализу слике. Такође је описала експерименталну поставку и анализу резултата добијених трансмисионом електронском микроскопијом, микро-Рамановом спектроскопијом, микроскопијом на бази атомских сила као и имунохистохемијске процедуре.

У делу **Резултати**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате својих истраживања у оквиру описаних модела. Три поглавља са 11 потпоглавља су адекватно илустрована кроз одговарајуће микрографије, графичке и табеларне приказе (18 панелних слика и две табеле). Поглавља у потпуности одговарају на постављене циљеве, и из њих се изводе закључци дисертације.

**Дискусија** је подељена на три поглавља са 10 потпоглавља која одговарају представљеним моделима, и у којима је изнет критички осврт на добијене резултате и њихово сагледавање у светлу постојећих литературних података

**Закључци** су донети сходно претходно наведеним циљевима, а на основу добијених резултата.

У поглављу **Литература** наведено је 129 библиографских јединица, што показује да је кандидат темељно приступио изучавању проблематике којом се бави у оквиру докторске дисертације.

## **Остварени резултати, оцена докторске дисертације и научни допринос**

Резултати ове докторске дисертације су дали потпуно нов увид у структурно ремоделирање дермалног колагена I, и по први пут је показано рутинско и стандардизовано коришћење напредних микро-спектроскопских метода на парафинским пресецима чиме је отворен пут њихове примене у биомедицинској дијагностици. Такође, по први пут је извршена корелација резултата добијених методима NLSM са конвенционалним методима за праћење финих структурних промена колагена од нивоа молекула до влакна, на моделима старења, третмана L-аргинином и дијабетеса типа 1. На тај начин, ова докторска дисертација отворила је могућност анализе архивираних узорака из банке хуманих и животињских ткива и тиме могућност потпуно новог сагледавања молекулског основа различитих обољења и стања. Утврђено је да L-аргинин доводи до формирања тањих и мање уређених влакана колагена, што сугерише на потенцијалну примену у биоинжењерингу дермалних замена у сврху регенерације коже. Примена третмана L-аргинином, чак и у кратком временском интервалу, доказује да се конформационе промене колагена проузрокована дијабетесом могу умањити, путем повећања синтезе аминокиселина пролин и хидроксипролин. Ови резултати наглашавају терапијски потенцијал и ефикасност третмана L-аргинином у превенцији и ублажавању оштећења колагена у дијабетичној кожи. Посебан научни допринос је и увођење микро-Раманове спектроскопије као методе посматрања финих биохемијских модификација у молекулу колагена на истим парафинским пресецима и њихова потврда методима имунохистохемије.

## **Закључак и предлог**

Анализа докторске дисертације кандидаткиње Ирене Д. Милер под насловом „Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“ показује да је кандидаткиња успешно реализовала постављене циљеве истраживања кроз свеобухватну и одговарајућу експерименталну поставку. Докторска дисертација представља оригиналан научно-истраживачки рад у области биофотонике који истражује колаген на свим хијерархијским нивоима напредним методама нелинеарне ласерске скенирајуће микроскопије у корелацији са низом других, конвенционалних микроскопских метода, али и микро-Рамановом спектроскопијом. Кандидаткиња Ирина Д. Милер је у свом истраживачком раду показала самосталност, научну зрелост и креативност који показују спремност за даљи самостални научно-истраживачки рад и сарадњу са мултидисциплинарним научним тимовима. У спроведеном истраживању је коришћен савремен и мултидисциплинаран приступ, доследно су примењене научне методе, а добијени

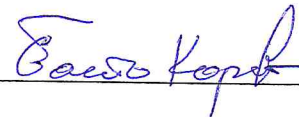


результати имају висок научни значај и јасну примењивост. Резултати добијени експерименталним радом који су представљени у овој докторској дисертацији су оригинални и значајни, као и адекватно представљени, анализирани и протумачени.

На основу свега наведеног, Комисија за оцену докторске дисертације предлаже Већу за студије при Универзитету да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње Ирене Д. Милер под насловом „Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“ и одобри јавну одбрану докторске дисертације.

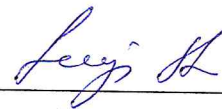
У Београду, 10.07.2024. год.

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**



---

Др Бато Кораћ, ванредни професор  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет  
и научни саветник  
Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -  
Институт од националног значаја за Републику Србију



---

Др Сања Стојановић, доцент  
Универзитет у Нишу-Медицински факултет



---

Др Мирјана Мићевић, научни сарадник  
Универзитет у Београду-Институт за физику-  
Институт од националног значаја за Републику Србију

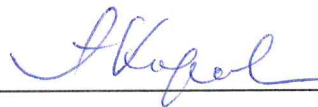
Већу за студије при Универзитету у Београду

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду извршена је софтверска провера оригиналности докторске дисертације „Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“ кандидаткиње Ирене Д. Милер коришћењем програма iThenticate. Увидом у извештај утврђена је подударност од 7%. Подударност са четири извора износи 1%. Један од извора са којим је нађена ова подударност је рад у међународном часопису који је објавила кандидаткиња и из кога је проистекла сама теза. Остала три извора су тезе на српском језику из области био-медицинских наука и сличности су везане за стручне термине, називи институција, уобичајене скраћенице, опште фразе и слично. Подударност са осталим изворима износи мање од 1% и односи се на генералне фразе и навођење литературе. Када се изнето узме у обзир, извештај потврђује оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Ирене Д. Милер, под насловом „Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 10.07.2024. год.

Ментори:



Проф. др Александра Кораћ, редовни професор  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет



Др Михаило Рабасовић, виши научни сарадник  
Универзитет у Београду-Институт за физику-  
Институт од националног значаја за Републику Србију