

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:

1. Датум и назив органа који је именовео комисију:

На 149. седници Наставно-научног већа Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, одржаној 24.09.2014. године, именована је комисија за оцену завршне докторске дисертације дипл. вет. Јелене В. Француски, асистента Факултета ветеринарске медицине на Катедри за патолошку физиологију, под насловом „*Ex vivo* карактеристике мезенхималних матичних ћелија изолованих из синовијалне течности коленог зглоба паса различите старости“, у саставу др Милица Ковачевић Филиповић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, др Анита Радовановић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, др Мирјана Лазаревић Мацановић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, др Горан Тулић, ванредни професор Медицинског Факултета Универзитета у Београду.

2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:

САСТАВ КОМИСИЈЕ:

др Милица Ковачевић Филиповић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. Ужа научна област Патолошка физиологија. Година избора у звање 2011.

др Анита Радовановић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. Ужа научна област Хистологија са ембриологијом. Година избора у звање 2013.

др Мирјана Лазаревић Мацановић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. Ужа научна област Радиолошка ултразвучна и ендоскопска дијагностика. Година избора у звање 2014.

др Горан Тулић, ванредни професор Медицинског Факултета, Универзитета у Београду. Ужа научна област ортопедска хирургија са трауматологијом. Година избора у звање 2013.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља, презиме:

Јелена, Владимир, Француски

2. Датум рођења, општина, Република:

21.11.1982. Панчево, Србија

3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:

4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

„*Ex vivo* карактеристике мезенхималних матичних ћелија изолованих из синовијалне течности коленог зглоба паса различите старости“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика, шема, графикана и сл.):

Докторска дисертација је написана на 149 страна и садржи 12 слика састављених из више појединачних фотографија, 6 шема, 7 графикана, 6 табела и 1 табелу у прилогу.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):

У *Уводу* су изнета досадашња схватања везана за мезенхималне матичне ћелије (ММЋ) и њихову потенцијалну примену у терапији оштећења хрскавице. Терапијски потенцијал ММЋ лежи у чињеници да, упркос њиховом релативно малом броју у ткивима одраслих јединки, *in vitro* ове ћелије имају велики пролиферативни потенцијал и способност диференцијације у адипоците, хондроците и остеобласте. Могућност диференцијације ММЋ у хондроците је једна од карактеристика која их чини ћелијама важним за репарацију дефеката хрскавице насталих као последица остеоартритиса.

У овом поглављу је истакнуто да остеоартритиси представљају велики проблем у хуманој и ветеринарској медицини и да се учесталост овог обољења не повећава само са старењем, већ се оно све чешће јавља и код младих јединки. Један од приступа терапији остеоартритиса је покушај репарације оштећене хрскавице различитим типовима ћелија које имају хондрогени потенцијал. Осим самих хондроцита, за које је познато да се *in vitro* могу умножити и поново искористити за санирање дефеката хрскавице, испитује се могућност да се ММЋ изоловане из различитих ткива такође употребе за ову намену. Осим перихондријума, синовијална мембрана вероватно има најјачи хондрогени потенцијал. Како је узорковање ћелија синовијалне мембране инвазивно, алтернативни метод представља узорковање синовијалне течности (СТ). У њој се налазе ћелије које су највероватније одлубљене од синовијалне мембране, а за које је код људи и лабораторијских животиња већ доказано да имају пролиферативни и хондрогени потенцијал.

Интернационално друштво за проучавање остеоартритиса (*OARSI*) је, на основу извршених бројних експерименталних студија, изнело мишљење да пас представља идеалан модел за испитивање остеоартритиса људи, тако да су информације добијене на псима важне не само за ветеринарску већ и за хуману медицину. И поред ове чињенице, у уводу је указано на недостатак литературних података који објашњавају везу између процеса старења и појаве остеоартритиса (ОА), али је истакнуто да генетски фактори, гојазност, механички фактори и друга обољења мишићно-скелетног система могу резултирати развојем овог патолошког стања. Поред тога, истакнуто је да недостају и подаци који се односе на карактеристике ћелија синовијалне течности као потенцијалног извора ћелија са значајним хондрогеним потенцијалом. Управо због тога, тема ове дисертације је актуелна и значајна.

У првом делу поглавља ***Преглед литературе***, изложена су конкретна актуелна сазнања и схватања која се односе на појам, дефиницију, поделу и карактеризацију матичних ћелија (МЋ). Као основне критеријуме дефинисања матичности кандидат наводи могућност самообнове, велики пролиферативни потенцијал и мултипотентност ћелија које се испитују. Такође, детаљно описује потенцијале за диференцијацију мезенхималних матичних ћелија (ММЋ) које су предмет овог рада, као и промене које настају са матурацијом ћелија. Кандидат истиче да је мали број истраживања посвећен испитивању особина ћелија које се налазе у синовијалној течности, а да код паса оваквих студија уопште нема. Код ове животињске врсте су до сада описане ММЋ из костне сржи, масног ткива и различитих ткивних структура у вези развоја зуба, међутим поступци узорковања тих ћелија доводе до оштећења ткива, болни су и захтевају општу анестезију животиње. Поред тога, истакнуто је да наведена ткива имају варијабилан хондрогени потенцијал. Управо из тог разлога је важно да се као извор ћелија за регенерацију хрскавице употребе ткива и структуре које онтогенетски имају потенцијал да се развију у хрскавицу, као што су перихондријум и синовијална мембрана. У овом делу су, такође,

описани биомаркери ћелијског старења, а изнета је и хипотеза старења ћелија *in vivo* и *in vitro*, као и досадашња сазнања и искуства у терапијској примени матичних ћелија у ветеринарској медицини, која су заправо врло оскудна.

У другом делу прегледа литературе дат је детаљан опис анатомских, хистолошких и физиолошких карактеристика зглобних структура, укључујући и преглед синовијалне течности. Поред тога, истакнут је и значај употребе биомаркера у дијагностици обољења локомоторног система, са акцентом на серум амилоид А, који представља један од најважнијих протеина акутне фазе код паса.

Опис хистолошке грађе хрскавице и синовијалне мембране паса, као и физиолошких механизма који се у овим структурама одвијају дат је са циљем да се стекне комплетан увид у структурну и функционалну целину зглоба, односно ткива која су извор матичних ћелија и која су евентуална мета ћелијске терапије у даљим истраживањима. Због тога су, такође, сажето описна механичка својства зглобне хрскавице, објашњен је утицај физичке активности на њен квалитет и изнета су досадашња схватања која се односе на процес старења хрскавице и настанак дегенеративних промена. Јасно су изнети савремени постулати патофизиолошког механизма настанка остеоартритиса, ћелијске терапије и ткивног инжињерства у терапији артропатија паса.

У поглављу **Циљеви и задаци истраживања** дефинисана су два циља на основу којих је постављено 8 задатака:

Први циљ је био да се окарактеришу и упореде ћелије изоловане из синовијалне течности младих и старих паса, односно да се утврди да ли те ћелије, умножене *in vitro*, имају особине ММТ, потом да се *in vitro* испита њихов фенотип и потенцијал ка адипогенези, остеогенези и хондрогенези, а да се посебно, *in vivo*, испита њихов потенцијал ка хондрогенези.

Други циљ је био да се окарактеришу и упореде зглобне структуре коленог зглоба паса различите старости и различитог типа физичке активности и то са клиничког, радиолошког и хистолошког аспекта како би се дефинисале промене везане за старење и утврдило присуство или одсуство инфламације у зглобу.

Да би се остварили описани циљеви постављени су **задаци** да се:

1. Код паса у овом испитивању изврши општи клинички, ортопедски и неуролошки преглед;
2. Код свих јединки изврши рендгенски преглед оба колена зглоба, левог и десног зглоба кука и лумбосакралног дела кичме методом рендгенографије;
3. Од свих јединки узоркује синовијална течност и изврши њен преглед у циљу дијагностике евентуалних субклиничких инфламаторних промена;
4. Из узорковане синовијалне течности изолују и у култури умноже присутне адхерентне ћелије и методом проточне цитометрије одреди експресија површинских маркера на основу којих се изоловане ћелије могу сврстати у нехематопоетске ћелије мезенхималног порекла (CD90+, CD34-);

5. Одреди *in vitro* број ћелија које могу да стварају колоније фибробласта и време за које се могу удвојити у култури као и да се испита присуство SA- β -галактозидазе, маркера старења;
6. *In vitro* испита потенцијал умножених ћелија да се диферентују ка адипоцитима, остеобластима и хондроцитима;
7. *In vivo*, на моделу ксенотрансплантата имунодефицијентним мишевима, испита хондрогени потенцијал умножених ћелија;
8. Изврши макроскопски преглед зглобних структура и хистолошка и имунохистохемијска анализа хрскавице и синовијалне мембране

У поглављу **Материјал и методе** наведен је коришћени материјал и дат је детаљан опис примењених метода. Узорци синовијалне течности, синовијалне мембране и хрскавице са субхондралном кости узорковани су из коленог зглоба 28 паса расе немачки овчар, мушког пола, који су сврстани у 4 групе према узрасту и нивоу физичке активности: млади радни, полицијски пси ($n = 4$), узраста 3-5 година; млади, нерадни власнички пси ($n = 5$) узраста 3-5 година; стари, радни полицијски пси ($n = 13$) старости 10-12 година и стари нерадни, власнички пси ($n = 6$) старости од 10-13 година. Хистолошке и имунохистохемијске анализе рађене су на узорцима синовијалне мембране и хрскавице са субхондралном кости 28 паса, док су ћелије изоловане из синовијалне течности 5 младих и 5 старих радних паса.

Време удвајања ћелија у култури, односно њихова брзина пролиферације (P3-P6) одређени су на основу почетног броја ћелија у култури и броја ћелија након трипсинизације култура са 80% конфлуентног раста. Број ћелија способан да формира колоније одређен је CFU-F тестом (engl. *Colony Forming Unit - Fibroblast*). Присуство маркера старења, SA- β -галактозидазе, потврђено је цитохемијски и квантификовано семиквантитативном методом. Проточном цитометријом установљене су фенотипске карактеристике умножених ћелија. Потенцијал за диференцијацију одређен је узгајањем ћелија у комерцијалном контролном медијуму и медијумима за адипогенезу, остеогенезу и хондрогенезу. Након 14 дана адипогене диференцијације, бојењем *Oil Red O* методом, испитивано је присуство масних капљица у ћелијама које су испољиле преадипоцитни фенотип. Након 5. и 10. дана остеогене диференцијације, биохемијски је одређена активност ензима алкалне фосфатазе у ћелијском лизату, док је *in situ*, цитолошки, алкална фосфатаза одређена цитохемијском методом. После 21 дан култивације ћелија у остеогеном медијуму, бојењем *in situ* ализарин црвеним, испитивано је присуство калцијума депонованог у екстрацелуларном матриксу (ЕЦМ), а имуноцитохемијском методом је доказано присуство остеокалцина. Након тронедељне хондрогене диференцијације ћелија у условима који имитирају тродимензионалост ткива хрскавице *in vivo* (ћелијске пелете), хистолошком анализом, уз помоћ алцијан плавог, испитивано је присуство сулфатисаних гликозаминогликана (сГАГ), а имунохистохемијски присуство

колагена типа II. Концентрација сГАГ одређена је и колориметријски и изражена у односу на количину ДНК добијену флуориметријским тестом, а вредности су приказане као однос количине ГАГ према ДНК у папаином дигестираним пелетама. *In situ* хибридизација је коришћена за испитивање експресије иРНА колагена типа I. *In vivo*, потенцијал ка хондрогенези испитиван је на 2 месеца старим имунодефицијентним мишевима. Ћелије из културе која је имала најбољи пролиферативни потенцијал (млад пас), узгајане су три недеље у хондрогеном медијуму у класичном систему адхерентне културе, трипсинизоване су, и имплантиране субкутано, у смеси са целулозним хидрогелом као носачем (Si-HPMC, енгл. *silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel*). Након 6 недеља, мишеви су жртвовани, а створена структура даље је процесуирана за хистолошке анализе. Добијени препарати су анализирани већ наведеним хистолошким методама за доказивање сГАГ и колагена типа II.

Рендгенски преглед оба колена зглоба, обављен је методом рендгенографије. Снимања су извршена помоћу рендгенског уређаја марке „Селенос 4“ ЕИ Ниш, при фокус-филм растојању 80 cm. Рендгенографија колених зглобова је обављана у растерећењу, снимања су извршена у две стандардне пројекције: антеро-постериорној (АП) и медио-латералној (МЛ), а употребљене кондиције су износиле 48 kV i 10-16 mAs. Да би се искључило истовремено присуство дисплазије кукова и синдрома *cauda equina*, обављено је рендгенско снимање карлице и лумбо-сакралног дела кичме свих испитиваних паса у вентро-дорзалној (ВД) и латеро-латералној (ЛЛ) пројекцији, при чему су кондиције за снимање износиле 50-55 kV i 16 mAs.

По завршеној артротомији, извршен је макроскопски преглед свих зглобних структура. Са латералног кондилуса фемура и латералног дела платоа тибије узети су узорци ткива за хистолошки и имунохистохемијски преглед хрскавице са субхондралном кости. За хистолошки преглед је узоркована и синовијална мембрана. Хистоморфометријски је одређена укупна дебљина хрскавице, укупан број хондроцита на вертикалном пресеку, као и густина и површина хондроцита. Светлосном микроскопијом анализиран је изглед површине хрскавице, облик хондроцита, морфологија изогених група, зона која дели калцификовану од некалцификоване хрскавице, субхондрална кост и заступљеност протеогликана и сГАГ. На пресецима синовијалне мембране, одређиван је број слојева ћелија, присуство кратких и прстоликих набора, као и ћелијске инфилтрације. Имунохистохемијски је испитано присуство и локализација колагена типа I, II и X у хрскавици и CD44 молекула у синовијалној мембрани. Извршена је цитолошка и биохемијска анализа синовијалне течности, као и одређивање концентрације САА уз помоћ имуноензимског теста (ЕЛИСА).

У поглављима *Резултати* и *Дискусија*, кандидат је изложио и анализирао добијене резултате и упоредио их са досадашњим научним сазнањима, логички их објаснио и извео јасне закључке. Комисија је у овом извештају детаљније анализирила најинтересантније налазе из наведених поглавља.

У поликлоналном систему узгајања ћелија у култури, ћелије изоловане из СТ имале су фибробластоидну морфологију и просечно време удвајања 31 сат, код младих паса и 46.5 сати код старих паса. CFU-F тестом је показано да између младих (0.55 ± 0.05 %) и старих паса (0.43 ± 0.23 %) нема значајних разлика у броју ћелија способних да формирају колоније. У просеку једна на 200 ћелија имала је способност стварања колонија, док је један мањи број ћелија имао способност формирања такозваних великих колонија састављених од више хиљада ћелија.

У просеку је око 60% ћелија уможених до треће пасаже на својој површини експримирали CD90 молекула, док исте ћелије уопште нису експримирали CD34 молекула, типичан за ћелије хематопоезског порекла и присутан на ендотелним ћелијама. После адипогене диференцијације, мали број умножених ћелија је имао депоноване масне капљице, без обзира на старосну категорију животиња од којих су ћелије изоловане, док су депозити соли калцијума и активност алкалне фосфатазе били значајнији у културама ћелија изолованих од старијих паса. Овај налаз је важан јер указује да се ћелије СТ старих паса не могу користити за процедуре које имају за циљ репарацију или регенерацију зглобне хрскавице паса. Такође је занимљив налаз да су умножене ћелије и у хондрогеном и контролном медијуму формирале пелете које су биле богате екстрацелуларним матриксом који је садржао сГАГ као и острвца ткива богата колагеном типа II. Овај налаз је интересантан са два аспекта: један је да умножене ћелије синовијалне течности имају потенцијал да се диферентују у хондроците после индукције са TGF- β који се налази у хондрогеном медијуму, али и спонтано, у контролном медијуму. Други аспект је да умножене и диференциране ћелије СТ могу да стварају хомогене структуре које имају велику сличност са интертериторијалним матриксом зглобне хијалине хрскавице која је богата колагеном типа II. Оригиналност овог налаза огледа се у чињеници да до сада није описан ни код једне врсте животиња, нити је овај феномен доказан са било којим другим ткивом као извором недиференцираних ћелија. *In situ* хибридизацијом је такође потврђена експресија иРНК за колегена типа I на површини пелета, што је указивало да се диференцијација ка хондроцитима који стварају хијалину хрскавицу одиграла у унутрашњости пелета, а да су на површини биле ћелије које су могле да стварају фиброзу хрскавицу. Како су ћелије у ксенотрансплантату синтетисале компоненте ЕЦМ карактеристичне за хрскавицу, доказано је да оне заправо задржавају дуготрајан (најмање два месеца) потенцијал да формирају компоненте ткива хрскавице. Активност ензима SA- β -галактозидазе уочена је у ћелијама младих и старих паса, али се са старењем паса број ћелија у којима се детектовала њена активност значајно повећао. Тај налаз је такође указивао да ћелије изоловане из СТ старих паса нису погодне за примену у терапијске сврхе. Како су испитиване ћелије показале ограничену мултипотентност, односно слабу адипогену диференцијацију и значајну експресију SA- β -галактозидазе, изнет је став да се изолована ћелијска популација не може окарактерисати као матична, али да она има својства бипотентних прогенитора који се могу диференцирати у остеобласте и хондроците.

Општим клиничким, ортопедским и неуролошким прегледом нису уочени знаци присуства обољења локомоторног система, нити је радиолошким прегледом колених зглобова установљено присуство промена које би говориле у прилог постојању остеоартритиса. Хистолошком анализом хрскавице уочено је да са старењем долази до смањивања дебљине хрскавице тибије, хипертрофије хондроцита површинске и средње зоне хрскавице фемура и експресије колагена типа X у некалцификованој хрскавици фемура и тибије. То је указало на постојање дегенеративних промена које нису нарушиле функцију хрскавице, али представљају предуслов за могућу појаву ОА. Физичка активност је испољила позитиван утицај на очување структуре хијалине хрскавице током старења јер колаген типа X није био присутан у површинској зони хрскавице старих радних паса. На синовијалној мембрани је са старењем уочено локализовано повећање броја слојева ћелија интима, без нарушавања њеног интегритета. Физичка активност је условила локалну појаву дугих прстоликих набора за које се може претпоставити да су се формирали као одговор на дуготрајно физичко оптерећење.

У поглављу *Литература* приказане научне публикације се односе на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској дисертацији):

Добијени резултати, посебно најважнији, истакнути су у поглављу *Закључци*

1. Синовијална течност паса садржи популацију ћелија мезенхималног порекла које могу да формирају колоније фибробласта, пролиферишу и имају слаб адипогени, добар остеогени и висок хондрогени потенцијал *in vitro*.
2. Висок хондрогени потенцијал наведених ћелија се огледа у спонтаној синтези сулфатисаних гликозаминогликана и колагена типа II који представљају основне компоненте екстрацелуларног матрикса хијалине хрскавице.
3. Испитиване ћелије *in vivo* задржавају дуготрајан хондрогени потенцијал што их чини занимљивим за даља испитивања у циљу регенерације хрскавице.
4. Ћелије изоловане из синовијалне течности старијих паса имају продужено време удвајања у култури, већи број старих ћелија и повећан остеогени потенцијал у односу на ћелије изоловане из синовијалне течности младих паса.
5. На основу свих изложених *in vitro* карактеристика може се претпоставити да синовијална течност паса садржи бипотентне и/или опредељене прогениторе за остеобласте и хондроците.
6. Старење доводи до умерених дегенеративних промена на хрскавици. Са старењем се смањује дебљина хрскавице тибије, долази до хипертрофије хондроцита у површинској и средњој зони и експресије колагена типа X у некалцификованој

хрскавици. Ове промене могу да створе предуслов за развој дегенеративног остеоартритиса током старења.

7. Физичка активност има позитиван утицај на очување интегритета хрскавице током старења. Физичка активност смањује експресију колагена типа X у површинској зони хрскавице.

VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА (навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):

На основу свега изнетог, Комисија сматра да докторска дисертација дипломираног ветеринара и асистента Катедре за патолошку физиологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, **Јелене В. Француски под називом „*Ex vivo* карактеристике мезенхималних матичних ћелија изолованих из синовијалне течности коленог зглоба паса различите старости“** представља оригинални допринос у истраживању мезенхималних матичних ћелија паса и промена током старења коштаног зглобог система. Добијени резултати су у складу са постављеним циљем и задацима истраживања а закључци произилазе из добијених резултата.

VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Јесте

2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију?

Сарджи

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

У овој тези је по први пут описан налаз острваца налик хијалиној хрскавици формираних *in vitro*, а од умножених ћелија синовијалне течности коленог зглоба паса. Показано је да су те ћелије код младих паса довољно потентне да се могу применити у протоколима за репарацију/регенерацију хрскавице, док се код старих паса исти тип ћелије не може користити за исту намену с обзиром на испољене ћелијске знаке старења и јачи остеогени потенцијал. Такође су по први пут описане промене на зглобној хрскавици код нехондродистрофичних паса током старења и по први пут је описано на који начин умерена физичка активност код паса утиче на очување структуре хијалине хрскавице током старења. На основу ових налаза се даље може испитивати ефекат комбинације

ћелија изолованих из синовијалне течности и биоматеријала у циљу санације дефеката на хрскавици.

IX ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три понуђених могућности):

Да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

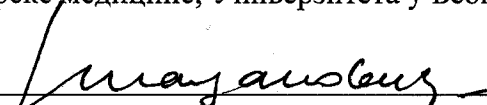
ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ:



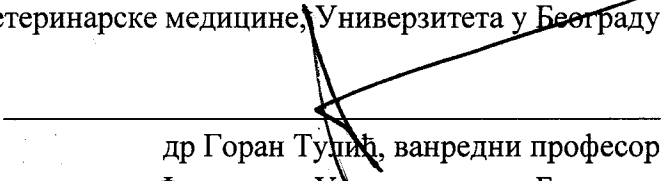
др Милица Ковачевић Филиповић, ванредни професор
Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду



др Анита Радовановић, ванредни професор
Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду



др Мирјана Лазаревић Маџановић, ванредни професор
Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду



др Горан Тујић, ванредни професор
Медицинског Факултета, Универзитета у Београду

У Београду, 13. 10. 2014. године.