

ВЕЋУ ЗА СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ У БЕОГРАДУ

Одлуком већа за студије при Универзитету бр. 06-4394/VII-2301/2-22 ЈКЈ/ донесеној на седници одржаној 13. јуна 2022. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације **„Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“**, кандидаткиње Ирене Милер (докторске студије Биофотоника).

На основу документације поднете уз пријаву теме, Комисија подноси следећи:

РЕФЕРАТ

1. Биографија кандидата

Ирена Милер је рођена 10. септембра 1990. године у Београду, где је стекла основно и средњошколско 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 је радила у Институту за примену нуклеарне енергије (ИНЕП) у Београду. Од новембра 2020. до јануара 2022. године је била запослена у Институту за нуклеарне науке Винча. Тренутно ради као истраживач сарадник Центра за биосистеме, на Институту Биосенс у Новом Саду.

2. Библиографија кандидата

2.1. Објављени радови (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)
- Janković, T, Danilović Luković, J, **Miler, I**, Mitić, N, Hajduković, L and Janković, M. Assembly of tetraspanins, galectin-3, and distinct N-glycans define the solubilization signature of seminal prostasomes from normozoospermic and oligozoospermic men. *Ups. J. Med. Sci* .2021; doi: [10.48101/ujms.v126.7673](https://doi.org/10.48101/ujms.v126.7673) (M22)

2.2. Конференције и научни скупови (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
- **Irena Miler**, Maja Nešić, Jelena Žakula, Lela Korićanac, Marija Radoičić, Aleksandra Korać, Marijana Petković, Milutin Stepić, „The metal-doped TiO2

3. Предмет и циљеви докторске дисертације

3.1 Предмет докторске дисертације

Кожа је један од највећих органа сисара која чини око 16% телесне масе и остварује бројне функције од којих је најважнија заштита од механичких повреда, UV зрачења, уласка патогена и нежељених супстанци у организам. Осим заштитне, кожа такође служи као сензитивни орган богат нервима, регулише телесну температуру, учествује у метаболизму масти, воде и соли. Хистолошки, кожа је организована у три слоја: епидермис, дермис и хиподермис. Епидермис изграђује четири типа ћелија: кератиноцити, меланоцити, Лангерхансове ћелије и Меркелове ћелије¹.

Испод епидермиса се налази дермис, везивно ткиво које даје потпору епидермису и повезује га са поткожним ткивом. Дебљина дермиса се креће у опсегу од неколико стотина микрометара до неколико милиметара и зависи превасходно од места на телу као и од врсте организма. Дермис је саграђен од ванћелијског матрикса и ћелија фибробласта који синтетишу компоненте матрикса уз присуство мастоцита, макрофага и адипоцита. У дермису се такође налазе фоликули длаке, знојне и лојне жлезде, нервни завршеци и рецептори, као и крвни и лимфни судови. Док је главна улога епидермиса да задржава влажност и да служи као баријера, дермис игра битну улогу у одређивању морфологије као и механичких карактеристика коже¹.

Најзаступљенија компонента у ванћелијском матриксу дермиса је структурни протеин колаген (око 70%), чија хијерархијска организација утиче на специфична механичка својства и дефиницију укупне функције ткива. Најчешћи тип колагених влакана дермиса су колагена влакна типа I (око 80%), затим су присутна и колагена влакна типа III (око 15%), док је остатак резервисан за друге типове колагена. Ретикуларни дермис углавном чини колаген типа I кога одликује изузетна чврстина. Комбинација колагених и еластичних влакана кожи даје флексибилност промене облика као и могућност подношења динамичких оптерећења. Дебљина, правац и дистрибуција колагених влакана је веома сложена јер се динамичка оптерећења могу вршити из различитих правца². Карактеристичне структурне промене у самој грађи и организацији колагених фибрила се дешавају код одређених обољења и могу потенцијално да служе као рани дијагностички маркери³. Колагена влакна су у сталној интеракцији са другим елементима дермиса, тако да промена структуре самог колагена има утицај на свеукупну структуру ванћелијског матрикса.

С обзиром на сложену интеракцију ванћелијског матрикса са осталим компонентама дермиса, веома је значајно испитати детаљну морфолошку анализу колагена, зато што су структурне модификације фибриларног матрикса директно повезане са разним физиолошким и патолошким процесима као што су старење, дијабетес, зарастање рана, канцер, итд⁴⁻⁶. У овом истраживању ће по први пут бити примењен модел корелативног праћења структурних промена колагена током старења и дијабетеса. Добијени резултати истраживања у оквиру ове теме допринеће могућности за даље прилагођавање и развијање напредних микроскопских техника при

праћењу специфичних промена и отворити пут примени добијених резултата у раној дијагностици одређених обољења коже.

3.2 Циљеви докторске дисертације

Циљ истраживања у оквиру предложене теме је корелативно праћење структурних промена дермиса током физиолошких (старење) и патолошких промена (дијабетес типа 1) коже конвенционалним и напредним микроскопским методима.

У оквиру овог циља, дефинисани су појединачни циљеви истраживања:

1. Испитати структурне промене дермиса коже пацова на нивоу молекула колагена, фибрила и влакна током старења;
2. Испитати структурне промене дермиса коже пацова на нивоу молекула колагена, фибрила и влакна током експериментално индукованог дијабетеса;
3. Користећи исте узорке испитати промене напредним микроскопским техникама и корелирати их са конвенционалним методима;
4. Испитати молекулски основ структурних промена колагена.

3.3 Хипотезе

- Познато је да на старење коже утичу различити фактори који доводе до промене редокс стања која могу да доведу до повећаних оштећења и деградације колагена. Имајући то у виду, претпоставка је да се структура ванћелијског матрикса, превасходно колагена као најзаступљеније компоненте дермиса мења током старења и доводи до повећаног ризика од настанка патолошких промена;
- Претпоставка је да ће Раманова спектроскопија дати резултате приликом испитивања молекулских промена у кожи изазваних хронолошким старењем и у дијабетесу типа 1, с обзиром да овај метод може да региструје специфичне сигнале за различите макромолекуле и омогућава идентификацију спектралних маркера дермиса;
- Претпоставка је да ће примена нелинеарне ласер скенирајуће микроскопије у комбинацији са стандардним микроскопским техникама омогућити праћење промена на нивоу молекула током старења коже *in vitro*, што ће помоћи испитивању структурних промена у патолошки измењеној кожи.

4. План рада

- Парафински пресеци коже пацова старих 15 дана, 1 месец и 21 месец ће се користити за праћење ефекта старења. Методи избора за визуализацију и квалитативну анализу колагена као главне компоненте коже ће бити дво-фотонска ласер скенирајућа микроскопија као и поларизација другог хармоника.
- Исти пресеци ће након тога бити обојени хематоксилином и еозином и посматрани на нивоу светлосне микроскопије. Трансмисиона електронска микроскопија ће се користити за процену ултраструктурних оштећења као и мерење дијаметра колагених влакана, а добијени подаци ће бити анализирани статистички.
- Биомаркери оксидационих оштећења проузрокованих старењем, 4-хидроксиноненал и нитротирозин, као и маркери ремоделирања ванћелијског матрикса, матриксне металлопротеиназе 2 и 9 ће бити анализирани имунохистохемијски.
- Парафински пресеци коже пацова код којих је експериментално изазван дијабетес типа 1 давањем инјекције алоксана ће се користити за праћење ефекта дијабетеса. Методи избора за визуализацију и квалитативну анализу колагена ће такође бити дво-фотонска ласер скенирајућа микроскопија као и поларизација другог хармоника.
- Пресеци ће након тога бити депарафинисани и урадиће се карактеризација спектралних маркера дермиса, односно колагена, Рамановом микроспектроскопијом.
- Добијени резултати биће искоришћени за додатно испитивање одабраних молекула од значаја за спречавање и/или поправку оштећења дермиса, превасходно колагена.

5. Методи које се користе у истраживању

У оквиру предложене докторске дисертације ће се користити следећи методи:

- Светлосна микроскопија, трансмисиона електронска микроскопија као и модалитети нелинеарне ласерске скенирајуће микроскопије – двофотонска микроскопија и други хармоник ће се користити за визуализацију, квалитативне као и квантитативне анализе.
- Раманова микроспектроскопија ће се користити за идентификацију спектралних маркера старења и детекцију структурних промена на нивоу молекула.
- Имунохистохемијски методи ће се користити за детекцију биомаркера оксидационих оштећења ванћелијског матрикса и фибробласта, као и маркера ремоделирања ванћелијског матрикса.

6. Мултидисциплинарност теме

Унапређење постојећих и развој нових система за детекцију промена током старења као и дијабетеса захтева мултидисциплинаран приступ, тако да ће се у току израде предложене дисертације примењивати знања и технике из различитих области. За испитивање утицаја старења и дијабетеса на кожу неопходно је применити знања из

области биологије, пре свега биологије ћелија и ткива. Биохемијским и имунохистохемијским анализама ће се добити резултати који ће прецизирати молекулски основ промена, односно, на ком нивоу и у ком сегменту је дошло до промене колагена током процеса старења и дијабетеса. Различите микроскопске технике морају бити примењене како би се проучиле ткивне промене до којих долази током поменутих процеса, а које је неопходно корелирати са конвенционалним методима у циљу компетентнијих и поузданијих резултата истраживања. Мултидисциплинарност је предуслов сагледавања комплексног одговора ћелија и ткива и као таква предуслов за предвиђање одговора организма приликом испитивања одређених физиолошких и патолошких процеса. Мултидисциплинарност такође доприноси развоју и унапређивању различитих микроскопских и спектроскопских техника без којих је данас немогуће доћи до комплетних научних резултата. Осим примене знања из различитих области, како би се остварили постављени циљеви, успостављена је и сарадња Биолошког факултета, Института за физику-Института од националног значаја за Републику Србију и Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду.

7. Очекивани научни доприноси докторске дисертације

Резултати ове дисертације би требало да допринесу не само новим сазнањима у области биологије ћелије и ткива већ и већем, рутинском и стандардизованом коришћењу напредних микроскопских метода на парафинским пресецима и њиховој примени у биомедицинској дијагностици. По први пут ће бити корелирани резултати добијени овим техникама са конвенционалним методима за праћење финих структурних промена колагена од нивоа молекула до снопа, на моделима старења и дијабетеса типа 1. На тај начин, овај докторски рад отвара могућност анализе архивираних узорака из банке хуманих ткива и тиме могућност потпуно новог сагледавања молекулског основа обољења.

С обзиром на то да ће се добити одговори шта се догађа на нивоу молекула током старења (као природног физиолошког процеса) и током дијабетеса типа 1 (као патолошког процеса) на моделу коже пацова, транслациони потенцијал предложених истраживања на хуману кожу је велики.

8. Библиографски подаци релевантни за докторску дисертацију

1. Yew, E., Rowlands, C. & So, P. T. C. Application of multiphoton microscopy in dermatological studies: A mini-review. *J. Innov. Opt. Health Sci.* **7**, (2014).
2. Ogura, Y., Tanaka, Y., Hase, E., Yamashita, T. & Yasui, T. Texture analysis of second-harmonic-generation images for quantitative analysis of reticular dermal collagen fibre in vivo in human facial cheek skin. *Exp. Dermatol.* **28**, 899–905 (2019).
3. Erikson, A., Örtengren, J., Hompland, T., de Lange Davies, C. & Lindgren, M. Quantification of the second-order nonlinear susceptibility of collagen I using a laser scanning microscope. *J. Biomed. Opt.* **12**, 044002 (2007).
4. Snedeker, J. G. & Gautieri, A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes -

- The good, the bad, and the ugly. *Muscles. Ligaments Tendons J.* **4**, 303–308 (2014).
5. Mostaço-Guidolin, L., Rosin, N. L. & Hackett, T. L. Imaging collagen in scar tissue: Developments in second harmonic generation microscopy for biomedical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
 6. Wu, S., Huang, Y., Li, H., Wang, Y. & Zhang, X. Quantitative analysis on collagen of dermatofibrosarcoma protuberans skin by second harmonic generation microscopy. *Scanning* **37**, 1–5 (2015).

9. Подаци о менторима

Име и презиме: **Александра Корач**, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет (биологија ћелија и ткива)

Списак радова објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jankovic A, Saso L, **Korac A**, Korac B. Relation of redox and structural alterations of rat skin in the function of chronological aging. *Oxid Med Cell Longev.* (2019) 2019:2471312. doi: 10.1155/2019/2471312. (M21)
2. Hmaid AAAA, Markelic M, Otasevic V, Masovic S, Jankovic A, Korac B, **Korac A**. Structural alterations in rat myocardium induced by chronic L-arginine and L-NAME supplementation. *Saudi J Biol Sci.* (2018) 25(3):537-544. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.022. (M21)
3. Stancic A, Jankovic A, **Korac A**, Buzadzic B, Otasevic V, Korac B. The role of nitric oxide in diabetic skin (patho)physiology. *Mech Ageing Dev.* (2018) 172:21-29. doi: 10.1016/j.mad.2017.08.018. (M22)
4. Jankovic A, **Korac A**, Buzadzic B, Stancic A, Otasevic V, Ferdinandy P, Daiber A, Korac B. (2017) Targeting the NO/superoxide ratio in adipose tissue: relevance to obesity and diabetes management. *Br J Pharmacol.* (2017)174(12):1570-1590. doi: 10.1111/bph.13498 (M21a)
5. Jankovic A, Ferreri C, Filipovic M, Ivanovic-Burmazovic I, Stancic A, Otasevic V, **Korac A**, Buzadzic B, Korac B. Targeting the superoxide/nitric oxide ratio by L-arginine and SOD mimic in diabetic rat skin. *Free Radic Res.* (2016) 50(sup1):S51-S63. DOI: 10.1080/10715762.2016.1232483 (M22)

Име и презиме: **Михаило Рабасовић**, научни сарадник, Институт за физику Београд, Универзитет у Београду (биофотоника)

Списак радова објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Despotović S, Milićević Đ, Krmpot A, Pavlović A, Živanović V, Krivokapić Z, Pavlović V, Lević S, Nikolić G, **Rabasović M**. Altered organization of collagen fibers in the uninvolved human colon mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor. *Sci Rep.* 10, (2020) 6359, DOI: 10.1038/s41598-020-63368-y (M21)
2. Lainović T, Margueritat J, Martinet Q, Dagany X, Blažić L, Pantelić D, **Rabasović M**, Krmpot A, Dehoux T. Micromechanical imaging of dentin with Brillouin microscopy. *Acta Biomater.* 105, (2020) 214-222, DOI: 10.1016/j.actbio.2020.01.035 (M21a)

3. Tornmalm J, Sandberg E, **Rabasovic M**, Widengren J. Local redox conditions in cells imaged via non-fluorescent transient states of NAD(P)H, *Sci Rep.* 9, (2019) 15070, DOI: 10.1038/s41598-019-51526-w (M21)
4. Mancic L, Djukic-Vukovic A, Dinic I, Nikolic M, **Rabasovic M**, Krmpot A, Costa A, Trisic D, Lazarevic M, Mojovic Lj, Milosevic O. NIR photo-driven upconversion in NaYF₄:Yb,Er/PLGA particles for *in vitro* bioimaging of cancer cells. *Mat Sci Eng. C-Bio.* 91, (2018) 597-605, DOI: 10.1016/j.msec.2018.05.081 (M21)
5. Despotović S, Milićević N, Milošević D, Despotović N, Erceg P, Svorcan P, Schumacher U, Ullrich S, Mihajlović G, Kalem D, Marković S, Lalić I, Krmpot A, **Rabasovic M**, Pantelić D, Jovanić S, Rösch T, Milićević Ž. Remodeling of extracellular matrix of the lamina propria in the uninvolved human rectal mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor, *Tumor Biol.* 39(7), (2017) 1-10, DOI: 10.1177/1010428317711654 (M22)

10. Закључак и предлог

Комисија, на основу претходно изложеног, сматра да је тема докторске дисертације кандидаткиње Ирене Милер научно оправдана и актуелна. Циљеви докторске дисертације су јасно постављени а методи адекватно одабрани и савремени.

Резултати истраживања у оквиру докторске дисертације допринеће бољем сагледавању молекулских промена колегена током старења и код дијабетеса типа 1, као и развоју напредних микроскопских техника у дијагностици обољења коже.

Комисија предлаже Већу за студије при Универзитету у Београду да прихвати тему „Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода“ и кандидаткињи Ирени Милер одобри израду докторске дисертације под менторством проф. Александре Кораћ и др Михаила Рабасовића.

У Београду, 01.07.2022. год.

Комисија:

Др Бато Кораћ, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Др Сања Стојановић, доцент
Универзитет у Нишу-Медицински факултет

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