

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену докторке дисертације **Лидије Ђ. Филиповић**, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 13. фебруара 2025. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени урађене дисертације кандидата Лидије Ђ. Филиповић, мастер биохемије, пријављене под насловом:

„Пречишћавање екстрацелуларних везикула имуноафинитетним методама и њихова карактеризација“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној 21.4.2022. године на захтев Хемијског факултета (евиденциони број: 89/8 од. 14.4.2022.) дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број: 61206-1633/2-22; 21.4.2022.).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата Лидије Ђ. Филиповић написана је на српском језику, на 101 страна А4 формата (фонт Times New Roman величине слова 12 pt, са проредом 1.0, маргинама (2cm). Дисертација садржи 24 слике, 34 табеле, 149 литературних навода. Дисертација се састоји из поглавља: Увод (2 стране), Преглед литературе (20 страна), Циљеви (1 страна), Наши радови (26 страна), Дискусија (5 страна), Закључак (1 страна), Материјали и методе (19 страна), Литература (9 страна). Поред тога дисертација садржи: информације о ментору и комисији (1 страна), Захвалницу на српском језику (2 стране), Сажетак на српском и на енглеском језику (по 1 страна), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (2 стране), Биографију кандидата на српском језику (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјава о истовестности (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Увод пружа преглед међућелијске комуникације са фокусом на улогу екстрацелуларних везикула (ЕВс) као посредника у преносу сигнала међу ћелијама. У овом је делу описана њихова структура, биогенеза и класификација, као и значај у физиолошким и патолошким процесима. Посебна је пажња посвећена методама изолације и карактеризације ЕВс. Јасно су изнета ограничења стандардних конвенционалних метода и потенцијал примене једнодомених антитела за изоловање ЕВс из различитих извора. У раду су приказани различити биолошки извори за изоловање везикула (плазма, урин, медијум различитих сисарских ћелијских линија). Поред развијања и примене нове методе за изоловање везикула, у овој је дисертацији описана и примена исте методе за њихово флуоресцентно обележавање.

Теоријски део је подељен на седам целина. Прва целина, **Пут откривања екстрацелуларних везикула и развој номенклатуре**, даје преглед историјског развоја ЕВс од њиховог открића па до данашње савремене класификације. Друга целина, **Класификација екстрацелуларних везикула**, објашњава класификацију везикула и њихове карактеристике. Трећа целина, **Биогенеза екстрацелуларних везикула**, детаљно описује процес биогенезе, механизме њиховог настанка укључујући ESCRT зависан и ESCRT независан процес. Четврта целина, **Биолошки састав и улога екстрацелуларних везикула**, анализира молекулски садржај ЕВс као и њихову улогу у међућелијској комуникацији и потенцијалну примену у различитим биомедицинским истраживањима. Пета целина, **Методе изоловања екстрацелуларних везикула**, обухвата различите технике које се користе за изоловање везикула из различитих биолошких извора. Шеста целина, **Стратегије за карактеризацију екстрацелуларних везикула**, описују методе за анализу ЕВс као што су проточна цитометрија, електронска микроскопија и друге молекуларне технике које се могу користити за потврђивање присуства везикула. Седма целина, **Бојење екстрацелуларних везикула**, обрађује примену липофилних боја, попут Oil red O, за означавање ЕВс али и поступке за елиминисање вишка боје како би се добили поуздани резултати. Додатно је описана имуноафинитетна метода као специфичан приступ за бојење везикула без губитка њихове биолошке активности. У овој су целини описани и начини уласка везикула у ћелију као и различите технике које се могу користити за праћење њихове интернализације.

Поглавље **Циљеви** представља основне циљеве ове докторске дисертације, као и конкретне задатке неопходне за њихову реализацију. Главни циљ је развој нове имуноафинитетне методе засноване на коришћењу наноантитела за изоловање ЕВс из различитих биолошких извора. У овом одељку су наведени конкретни задаци који су спроведени како би се испунили главни циљеви тезе.

Поглавље **Наши радови** приказује резултате остварене током израде ове докторске дисертације. Оно је подељено у осам целина:

- **Производња и пречишћавање наноантитела:** Представљен је процес експресије наноантитела (VHH- GFP), њихово пречишћавање и карактеризација.
- **Синтеза полимера и карактеризација:** Описан је поступак синтезе полиметакрилатног носача, испитивање његове порозности, одређивање капацитета везивања протеина као и дефинисање стабилности конструката на носачу кроз тестирани временски период.
- **Развој и оптимизација протокола за изоловање екстрацелуларних везикула (ЕВс):** Након развоја методе, она је коришћена за изоловање ЕВс, а њима су потом одређени број, концентрација протеина и липида, морфологија, и присуство специфичних протеинских маркера.
- **Поређење метода ултрацентрифугирања и имуноафинитетне хроматографије за изоловање (ЕВс):** Ново развијена метода је упоређена са методом која се сматра „златним стандардом“ – методом ултрацентрифугирања.
- **Испитивање репродукцибилности методе:** Процењена је стабилност и репродукцибилност имуноафинитетног протокола за изоловање ЕВс
- **Бојење екстрацелуларних везикула:** Оптимизован је протокол за бојење ЕВс липофилним бојама, Oil red O, директно на полиметакрилатном носачу. Испитан

је процес елиминисања вишка боје а ефекат бојења је праћен спектрофотометријским методама.

- ***In vitro* преузимање обојених екстрацелуларних везикула:** Анализирано је преузимање претходно обојених везикула од стране Skbr3 ћелија помоћу проточне цитометрије. Испитан је утицај различитог времена инкубације и различитих концентрација везикула, чиме је потврђено да је преузимање зависно од количине везикула и дужине инкубације.

Поглавље **Дискусија** критички анализира добијене резултате и поставља их у контекст литературних података. Поређењем експерименталних резултата са подацима из литературе, потврђују се почетне хипотезе, уз предлагање могућих објашњења установљених чињеница.

Поглавље **Закључак** пружа сажет преглед резултата докторске дисертације и одговара на питања постављена у оквиру њених циљева.

Материјал и методе садрже детаљан опис коришћене опреме, реагенса, узорака као и експерименталних метода и процедура примењених у истраживању.

Б. Кратак приказ резултата

У овој докторској дисертацији развијена је нова метода за пречишћавање екстрацелуларних везикула (ЕВс) из различитих биолошких извора. За ту сврху коришћена су наноантитела селектована из наивне VHH (енгл. Heavy chain only) библиотеке директно на ЕВс из ћелијских линија карцинома дојке (Skbr3), након деплетирања на везикулама из ћелија бубрега хуманих ембриона (Hek293). Позитивни клонови су секвенцирани и преклонирани у вектор pET14b за експресију са eGFP и хистидинским тагом. Конструкти D5, H1 и G2 имају нешто више аминокиселина од H6 и B1, али су им масе веома сличне. Изоелектричне тачке варирају од 6,14 (H6) до 7,73 (G2), што указује на разлике у саставу аминокиселина. Алифатични индекс показује сличну температурну стабилности свих конструката. Клонирани протеини су експримирани у бактеријама, а успешност експресије праћена је SDS-PAGE електрофорезом. Уочена је трака на 42 kDa, што је потврдило успешну експресију, при чему се G2-GFP најбоље, а H6-GFP се најслабије експримира. Након лизе ћелија, протеини су пречишћени метал-афинитетном хроматографијом захваљујући хистидинском тагу. SDS-PAGE анализа је потврдила чистоћу препарата и очекивану масу ~42 kDa. Добијени протеини су даље коришћени за имобилизацију на полиметакрилатни носач.

Након синтезе полиметакрилатног носача, живином порозиметријом је испитана његова порозност. Просечна величина пора након имобилизације и блокирања носача износила је 80-92 nm, што је мање од литературних вредности 150 nm. Проценат порозности био је 60 %. Да би везивање било стабилније увођена је амино група пре додатка наноантитела. Елементарна анализа показала је да након аминације полимера количина амино група је 0.025 g на 1 g полимера. Скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) одређена је величина честица полимера, која износи од 125-250 μ m, што је у складу са димензијама сита која су коришћена за просејавање полимера након синтезе. За одређивање капацитета носача коришћен је BSA као модел протеин. Лангмуирова изотерма показује однос везаног и неvezаног протеина, при чему изотермална крива има облик хиперболе, што указује на постизање максималног капацитета везивања. Линеаризацијом криве, одређена је максимална концентрација протеина који се могу везати за носач. Она је износила $Q_{\max}$ (48,10 mg/mL), док константа дисоцијације износи 2,62 nM.

Након синтезе и аминације, полиметакрилатни носач је активиран глутаралдехидом и сваки конструкт је додат у количини од 100 μ g на 1 g влажног полимера и инкубирано је преко ноћи. Ефикасност имобилизације, проверена је Бредфордним реагенсом и износила је 99%, без детектованих заосталих протеина.

Функционализовани полимер коришћен је за изоловање ЕВс из плазме добровољних даваоца. Стабилност имобилисаних антитела праћена је током осам недеља. Полимер је чуван на 4 °C, а изоловања су понављана недељно током прве три недеље, затим након паузе од три недеље поновљена су у шестој и осмој недељи. Резултати су показали да је стабилност имобилисаних антитела потпуно очувана током четири недеље. После шесте недеље примећен је благи пад ефикасности (23-27%), односно након тог периода у изолованим узорцима ЕВс детектоване су нешто ниже концентрације протеина. У узорцима након прве и осме недеље је коришћењем проточне цитометрије праћено присуство антигена CD9 једног од главних биомаркера ЕВс. Везикуле су имобилисане на латексна зрна и након блокирања и испирања, детекција је рађена употребом моноклонских анти-CD9 антитела. Аутофлуоресценција зрна коришћена је као контрола,

док је померај флуоресценције удесно доказивао присуство антигена CD9. Резултати су показали да је ниво детектованог антигена остао непромењен током осам недеља, са 90% позитивних догађаја у свим узорцима. Имуноафинитетно пречишћавање EVc из плазме добровољних давалаца и ћелијских култура прилагођено је специфичности полазног материјала. За ову сврху на полиметакрилатни носач имобилисано је укупно 500 μg наноантитела на по 1 mL полимера. Полимер је инкубиран са плазмом здравих донора и медијумима ћелијских култура (Hek293, Skbr3, Jurkat) уз мешање током два сата. Након тога испран је пуфером и везикуле су елуиране променом pH вредности. (200 mM глицин, pH 2.2) Елуција EVc је праћена мерењем концентрације протеина у прикупљеним фракцијама. Након тога креиран је хроматограм које је показао два изражена пика, што указује на присуство различитих популација EVc. Насупрот томе, хроматограм EVc из ћелијске линије Hek293 приказао је само један елуциони пик, што потврђује хомогенији узорак. Ови резултати су у складу са анализом NTA (енгл. Nanoparticle tracking analysis) која је потврдила већу хетерогеност EVc из хумане плазме. NTA анализом одређена је концентрација и дистрибуција величине EVc изолованих из хумане плазме и ћелијских култура. EVc из Hek293 ћелијске линије имају просечан дијаметар од $164 \pm 64.7 \text{ nm}$, док за Jurkat ћелијску линију износи $147.2 \pm 55.4 \text{ nm}$. Везикуле из хумане плазме имају просечан дијаметар од $195.4 \pm 88.3 \text{ nm}$. Финална концентрација изолованих везикула за Hek293 EVc износила је $4.01 \times 10^9 \pm 0.01 \times 10^9$ честица/mL, за Jurkat EVc $2.01 \times 10^9 \pm 0.03 \times 10^9$ честица/mL, док је за серумске EVc износила $4.05 \times 10^9 \pm 0.01 \times 10^9$ честица/mL. Статистичком обрадом показано је да иста имуноафинитетна хроматографија изолује статистички различиту концентрацију везикула у зависности од типа полазног материјала.

Детекција површинских антигена CD9, CD63 и CD81 на EVc праћена је употребом проточне цитометрије. Везикуле су имобилисане на латексна зрна преко ноћи на 4 °C, а затим блокиране. Детекција је извршена коришћењем три различита антитела: Anti-CD9-PE, Anti-CD63-AlexaFluor 488nm и Anti-CD81 PE/Dazzle. Резултати показују пораст флуоресценције у односу на контролу, где су проценти позитивних догађаја за антиген CD9 износили: $30,20 \pm 1,42\%$ за EVc из Hek293; $28,35 \pm 2,62\%$ за Jurkat и $24,05 \pm 5,44\%$ за плазму. У случају антигена CD63 вредности су следеће: $30,95 \pm 0,78\%$ за Hek293; $20,20 \pm 0,57\%$ за Jurkat; $3,90 \pm 0,14\%$ за плазму. Док за антиген CD81 проценат позитивних догађаја је износио: $26,65 \pm 0,50\%$ за Hek293; $9,45 \pm 0,21\%$ за Jurkat, $13,45 \pm 0,70\%$ за плазму. Резултати показују значајне разлике у експресији маркера између различитих извора за изоловање екстрацелуларних везикула. Присуство CD63 антигена у узорцима EVc из плазме потврђено је коришћењем „Western blota“, и резултати су показали присуство траке на око 50 kDa, што је очекивана маса протеина CD63.

Изоловане EVc из серума анализирани су електронском микроскопијом. Она је потврдила присуство везикула, карактеристичне сферичне структуре, са дијаметром у распону од 50 до 200 nm. Додатно, скенирајућа електронска микроскопија, при увећању од 100,000 пута, потврдила је присуство изолованих EVc, такође приказујући честице сферног облика у истом распону дијаметра (50-200 nm).

Након што је развијена имуноафинитетна хроматографија за изоловање EVc из медијума ћелијских линија и хумане плазме, следећи је корак био оптимизовање протокола за изоловање EVc из урина. Урин је инкубиран са функционалним полимером преко ноћи а након испирања невезаних фракција тестирана су два различита типа елуирања EVc:

први је континуирана елуција на колони уз сакупљање елуираних фракција, а други приступ је био двостепена елуција бач приступом. Ови су приступи упоређени анализирањем концентрације и величине ЕВс употребом NTA. Резултати су показали да тип елуирања утиче на дистрибуцију величина ЕВс. Континуирана елуција на колони имала је ужу расподелу величина са највећим бројем честица величине од 70 nm и просечним дијаметром од $100,12 \pm 15,9$ nm. Двостепена бач елуција резултирала је у широј расподели величина са највећим бројем честица од 100 nm и просечним дијаметром од $124,8 \pm 2,47$ nm. Указујући да је дуже контактено време са елуционим пуфером резултирало у елуирању већих ЕВс. Такође, у погледу приноса, двостепена бач елуција показала је боље вредности. Овај приступ резултира у концентрованијем узорку, чиме се избегава редуковање запремина и ризик од губитка ЕВс током таквог корака.

Како би се додатно окарактерисала ефикасност ново развијене методе, урин је коришћен као модел систем за изоловање ЕВс уз коришћење два приступа: метода ултрацентрифугирања (CFG) и имуноафинитетно пречишћавање (IM). ЕВс добијене из ова два приступа су анализирани различитим биохемијским и инструменталним техникама. Резултати су показали да је ултрацентрифугирање имало сличан резултат детектованих биомаркера CD9 (40%), CD63 (55%), и CD81 (35%) у поређењу са вредностима добијених имуноафинитетном хроматографијом CD9 (25%), CD63 (70%), и CD81 (45%). Вредност CD9 антигена је нижа код IM приступа али вредности друга два антигена су виша. Међутим у погледу концентрације протеина и липида, CFG је дало веће вредности протеина (1.349 mg/mL) и липида (0.522 mg/mL) у поређењу са IM протеина (0.279 mg/mL) и липида (0.074 mg/mL). Ова детектована разлика јасно сугерише да употреба методе CFG даје велике количине контаминација других неvesикуларних структура, што се прати кроз однос броја протеина и липида. У случају CFG тај коефицијент је нижи и износи 2.659 ± 0.716 , док у случају IM износи 3.819 ± 0.531 . Када је упоређена концентрација добијених ЕВс, оба приступа су дала сличан број везикула (10^9 честица/mL). Међутим IM приступ је резултирао већим бројем мањих везикула (распон 52.5-112.5 nm), док је CFG добијено више већих везикула (распон 87.5-137.5 nm).

Везикуле изоловане из урина употребом IM анализирани су помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM) и микроскопије атомских сила (AFM). SEM анализа показала је сферне структуре у опсегу величина од 50-115 nm. На увећаном приказу је уочено да површина појединачне везикуле није глатка сугеришући да IM не утиче на морфолошке карактеристике самих ЕВс. AFM анализа је додатно пружила увид у површинску морфологију, са приказима дводимензионалних и тродимензионалних слика везикула. Резултати су показали структуре ЕВс пречника између 40-60 nm.

Репродуцибилност IM за изоловање ЕВс из хумане плазме и урина тестирана је кроз више узастопних понављања изоловања. У узорцима из хумане плазме, праћењем концентрације протеина и липида није примећено статистички значајно одступање. Такође праћењем присуства антигена CD9, померај флуоресценције је такође јако сличан за сва три изоловања. Поред тога, репродуцибилност је тестирана и на урину, кроз три независна циклуса изоловања IM. Просечна концентрација протеина у изолатима је била претежно константна без статистички значајних одступања, што је опет потврдило добру репродуцибилност методе.

Ради праћења преузимања ЕВс, имуноафинитетна хроматографија је коришћена за бојење ЕВс употребом липофилне боје Oil Red O. ЕВс прикупљене из медијума Skbr-3 ћелијске линије нанете су на полиметакрилатни носач са VHH, потом је нанета боја, а вишак боје је уклоњен испирањем са пуфером, док су обојене елуиране променом рН. Ефекат бојења је праћен мерењем апсорбанце на 495 nm и 595 nm, при чему је примећен пораст апсорбанце, што је указало на елуирање обојених ЕВс. За праћење ефекта преузимања обојених ЕВс од стране ћелија, коришћена је проточна цитометрија. Тестиране су две количине додатих везикула (нормиране према концентрацији протеина, 3 и 6 μg) и резултати су показали да већа концентрација ЕВс доводи до израженијег помераја флуоресценције. Такође је тестирано различито време инкубације где је примећено да продужавањем инкубације на више часова доводи до већег помераја флуоресценције у поређењу са краћим временом инкубације. Резултати су јасно показали да је преузимање ЕВс од стране ћелија и временски и концентрацијски зависно.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Екстрацелуларне везикуле (ЕВс) су кључни посредници међућелијске комуникације. Ослобађају се из једног типа ћелија, путују кроз циркулацију, делују на друге ћелије и тако преносе различите сигнале. Њихова способност проласка кроз биолошке баријере чини их посебно значајним за различите примене.[1] Због природне способности преноса биомолекула, ЕВс се могу користити као носачи лекова, побољшавајући циљану доставу и смањујући нуспојаве. Поред тога могу се користити и као веома добар дијагностички алат за праћење различитих болести. [2, 3] Главни изазов у истраживањима ЕВс је избор одговарајуће методе за њихово изоловање из понекад веома комплексних биолошких извора, како би се добио чист и поуздан препарат. Према истраживању Интернационалног друштва за екстрацелуларне везикуле, до 2015. године, ултрацентрифугирање је било најзаступљенија метода, коришћена у чак 81% истраживања. Поред ње користе се и бројне друге технике, укључујући филтрацију, ултрафилтрацију, ултрацентрифугирање, центрифугирање у градијенту густине, таложење помоћу различитих полимера. [4] Тренутне методе имају бројна ограничења, нека од њих су потреба за великим количинама узорака, висока цена, робусност опреме, дуготрајни поступци изоловања или негативни утицај на структуру самих ЕВс. Такође, многе методе које се користе не могу да разликују везикуле које потичу од здравих ћелија од оних које потичу од патолошких измењених ћелија. Због тога је развој методе за специфичније изоловање одређених популација ЕВс из клиничких узорака кључан за унапређење овог научног поља. Имуноафинитетне методе су посебно корисне за изоловање специфичних популација ЕВс, посебно када се прича о истраживањима туморских обољења. Туморске ћелије често имају специфичне протеине на површини својих ЕВс, попут EGFR, EpCAM, Mart-1 i TYRP2. Ови протеини омогућавају развој антитела која селективно препознају само везикуле које експримирају ове протеине, што побољшава прецизност истраживања патолошких стања. [5]

Комплексност биолошких узорака представља изазов за имуноафинитетне методе, јер коришћење антитела која препознају само један антиген смањује хетерогеност изолованих ЕВс. Према литератури [6], комбинација више антитела омогућава изоловање више различитих класа везикула. Кључни фактор је контрола афинитета и авидитета везивања, јер превисок афинитет може довести до губитка везикула и њихове лизе приликом елуирања.[7] Техника хибридома је омогућила развој и употребу антитела у биолошким и медицинским истраживањима, омогућавајући непрекидну производњу специфичних мишјих антитела на различите антигене. Међутим у раду са конвенционалним антителима проблем представља њихова величина, стабилност и цена производње. Због своје величине подложни су хидролизи, цена њихове производње је висока, па је било неопходно пронаћи алтернативни пут креирања специфичних агенаса.[8] Откриће да ламе имају способност производње антитела која се састоје само од тешких ланаца (наноантитела) омогућило је поједностављење и смањење производње специфичних агенаса за препознавање антигена. Предности наноантитела у односу на конвенционална антитела су лакша манипулација, боља стабилност, јефтинија производња, бољи продор кроз чврста ткива али и кроз крвно-мождану баријеру, смањена имуногеност, висока стабилност и солубилност.[9-11]

Ова докторска дисертација имала је за циљ развој новог приступа за изоловање ЕВс, користећи наноантитела селектована директно на антигенима ЕВс и полиметакрилатни

носач као чврстој фази. Носач, синтетисан од полиметакрилне киселине, раније је коришћен за имобилизацију ензима због своје способности да допринесе очувању њихове активности, чиме се продужава њихова функционалност. [12-14] У овој тези, он је први пут искоришћен као чврста фаза која носи наноантитела специфична за ЕВс.

У овом раду, применом наноантитела са средњим афинитетом и нижом заступљеношћу на носачу, постигнути су услови за елуирање оптимални за изоловање везикула без оштећења њихове структуре. Овај приступ је обезбедио стабилно везивање током хроматографије, док се елуција постиже благим променама услова и без нарушавања структуре ЕВс, што је у складу са литературним подацима. [15]

Наноантитела која су коришћена за везивање ЕВс су произведена у *E. coli*, а након метал-афинитетне хроматографије добијени су чисти препарати. Да би се осигурала добра и стабилна интеракција носач је пре имобилизације протеина аминован. Присуство GFP протеина олакшава визуелизацију али и олакшава правилну оријентацију наноантитела на матрикс. Ефикасна и контролисана имобилизација омогућила је стабилно везивање при чему су антитела задржала функционалност осам недеља уз чување на 4°C. Карактеризација носача је показала високу порозност са пречником пора од 90 nm, што омогућава изоловање ЕВс уз минималан губитак њиховог садржаја. Максимални капацитет матрикса за протеине износио је 48.1 mg/mL. Тестиран је на узорцима ЕВс из супернатанта ћелијских култура, плазме и урина уз контролисане услове рада. Узорци су прикупљени у складу са ISEV препорукама, а сви донори су потписали етичку сагласност. Овај приступ нуди ефикасну, брзу, јефтину методу за изоловање ЕВс погодну за разна биомедицинска истраживања. [16]

У овом истраживању анализирани су ЕВс помоћу више различитих инструменталних техника. За потврду присуства три главна антигена (CD9, CD63 и CD81) на проточном цитометру коришћена су моноклонска антитела. Због својих малих димензија ЕВс се не могу директно снимати, па се то решава имобилизацијом на епоксидна латексна зрна. Присуство везикула додатно је потврђено третманом нејонским детергентом (Тритон) који је утицао на значајан пад сигнала флуоресценције услед губљења структуре везикула. Поред проточне цитометрије, ЕВс су анализирани праћењем кретања наночестица (NTA), које је показало различите концентрације везикула у узорцима плазме, урина и ћелијских култура. [17] Електронске микроскопије (TEM, SEM) и микроскопија атомских сила (AFM) потврдиле су њихову морфологију, стабилност и одсуство агрегације које се често дешава код употребе других методе. Оптимизација корака елуирања ЕВс са имуноафинитетног матрикса показала је да бач елуција даје већи принос и шири спектар величина везикула у поређењу са континуираном елуцијом на колони. Поређењем методе која се најчешће користи за изоловање ЕВс, ултрацентрифугирање, са ново развијеном имуноафинитетном методом показало је да она омогућава добијање чистијег препарата, са мање контаминација протеина. Управо је ово важна предност имуноафинитетне методе јер омогућава праћење и анализирање протеома и липида. Она минимализује контаминације али у исто време чува интегритет везикула што је кључно за различита истраживања.

До сада су се за визуелизацију и праћење преузимања ЕВс користили различити приступи, укључујући генетски инжењеринг и флуоресцентно обележавање. Липофилне боје попут „РКН“ су стандардне, али имају ограничења, попут агрегације и спонтаног

ослобађања са везикула. Како би се то превазишло, у овом раду примењена је метода бојења ЕВс на полиметакрилатном носачу користећи липофилну, Oil Red О боју.[18, 19] Везикуле су обојене током протока кроз колону, а вишак боје елиминисан испирањем пре елуирања. Обојене ЕВс су праћене током преузимања од стране SKBR3 ћелија. Показано је да је преузимање зависно од времена и концентрације. Нова имуноафинитетна метода је брза, репродуктивна и примењива за изоловање ЕВс из различитих типова узорака. Систем је једноставан, скалабилан и економски исплатив са великим потенцијалом за изоловање везикула у различите сврхе. Ова нова метода не нарушава њихову структуру али такође чува и њихову биолошку улогу, чинећи је перспективном за разна истраживања и клиничке примене.

Референце:

1. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake*. Cellular and molecular neurobiology, 2016. **36**: p. 301-312.
2. Chen, M. and H. Zhao, *Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection*. Human genomics, 2019. **13**(1): p. 34.
3. Alimirzaie, S., M. Bagherzadeh, and M.R. Akbari, *Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review*. Clinical genetics, 2019. **95**(6): p. 643-660.
4. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. Journal of extracellular vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
5. Tauro, B.J., et al., *Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes*. Methods, 2012. **56**(2): p. 293-304.
6. Monegal, A., et al., *Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (Lama glama) naïve libraries*. Developmental & Comparative Immunology, 2012. **36**(1): p. 150-156.
7. Spitznagel, T.M. and D.S. Clark, *Surface-density and orientation effects on immobilized antibodies and antibody fragments*. Bio/technology, 1993. **11**(7): p. 825-829.
8. Reichert, J.M. *Antibody-based therapeutics to watch in 2011*. in *MAbs*. 2011. Taylor & Francis.
9. Smolarek, D., O. Bertrand, and M. Czerwinski, *Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine?* Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej, 2012. **66**.
10. VK, N., *Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C_{H1} domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies*. Mol Immunol, 1999. **36**: p. 515-524.
11. Popovic, M., et al., *Isolation of anti-extra-cellular vesicle single-domain antibodies by direct panning on vesicle-enriched fractions*. Microbial cell factories, 2018. **17**: p. 1-13.
12. Prodanović, R., et al., *Immobilization of invertase and glucoamylase on a macroporous copolymer of etyleneglycoldimethacrylate and glycidyl methacrylate and potential applications in biotechnology*. Hemijska industrija, 2003. **57**(11): p. 536-542.
13. Prodanović, R., S. Jovanović, and Z. Vujčić, *Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate*. Biotechnology Letters, 2001. **23**: p. 1171-1174.
14. Miletić, N., A. Nastasović, and K. Loos, *Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications*. Bioresource Technology, 2012. **115**: p. 126-135.
15. Reiner, A.T., et al., *Concise review: developing best-practice models for the therapeutic use of extracellular vesicles*. Stem cells translational medicine, 2017. **6**(8): p. 1730-1739.
16. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. Journal of extracellular vesicles, 2024. **13**(2): p. e12404.
17. Piontek, M.C., R.B. Lira, and W.H. Roos, *Active probing of the mechanical properties of biological and synthetic vesicles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2021. **1865**(4): p. 129486.
18. Bharati, S., et al., *Oil Red O based method for exosome labelling and detection*. Biochemical and biophysical research communications, 2022. **611**: p. 179-182.
19. Dominkuš, P.P., et al., *PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2018. **1860**(6): p. 1350-1361.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекле следеће публикације:

Радови:

1) Врхунски међународни часопис (M21):

- Filipović, L., Spasojević, M., Prodanović, R., Korać, A., Matijašević, S., Brajušković, G., ... & Popović, M. (2022). Affinity-based isolation of extracellular vesicles by means of single-domain antibodies bound to macroporous methacrylate-based copolymer. *New Biotechnology*, 69, 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.03.001> (IF 6.07, (2021))
- Filipović, L., Spasojević Savković, M., Prodanović, R., Matijašević Joković, S., Stevanović, S., Marco, A. D., ... & Popović, M. (2024). Urinary Extracellular Vesicles as a Readily Available Biomarker Source: A Simplified Stratification Method. *International journal of molecular sciences*, 25(15), 8004. <https://doi.org/10.3390/ijms25158004>, (IF 6.2, (2022))

2) Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

- **Lidija Filipović**, Milica Spasojević, Radivoje Prodanović, Aleksandra Korać, Suzana Matijašević, Goran Brajušković, Ario de Marco, Milica Popović „Developing reversible immuno-affinity capture for extracellular vesicles purification“, Book of Abstracts 8th SBS Conference: “Amazing Biochemistry“. September 2022, p-66, Novi Sad, Serbia.
- **Lidija Filipović**, Milica Spasojević, Ario de Marco, Milica Popović. “Nanobody-based immunoaffinity chromatography for the capture of urine-derived extracellular vesicles“, Book of Abstracts 12th SBS Conference “Biochemistry in Biotechnology“, p119, September 2023, Belgrade, Serbia
- **Lidija Filipović**, Radivoje Prodanović, Milica Spasojević, Suzana Matijašević, Goran Brajušković, Milica Popović. “Novel nanobody-based immunoaffinity chromatography for the capture of urine-derived extracellular vesicles“, Book of Abstracts 47th FEBS Congress: “Together in bioscience for a better future“, P-03-2-09, 8-12. July 2023, Tours, France.

3) Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)

Filipović, L., Spasojević, M., Prodanovic, R., Gavrović- Jankulović, M., Popovic, M. Development immunoaffinity chromatography for purification extracellular vesicles- Book of Abstract of the IX Conference of the Serbian Biochemical Society: “Diversity in Biochemistry“, p.93, 14-16 November 2019, Belgrade, Serbia

Д. 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 под насловом **„Пречишћавање екстрацелуларних везикула имуноафинитетним методама и њихова карактеризација”**, аутора **Лидије Филиповић**, констатујем да утврђено подударање текста износи **8%**. Овај степен подударности последица је навести претежне разлоге (нпр. цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације), што је у складу са чланом 9. Правилника.

Б. Закључак

Ова докторска дисертација представља значајан допринос у области биомедицинских истраживања. Развој нове методе засноване на наноантителима за изоловање и пречишћавање екстрацелуларних везикула (ЕВс) из различитих биолошких извора. Сprovedена су детаљна истраживања како би се утврдиле карактеристике изолованих ЕВс, њихова биолошка активност и потенцијална примена у даљим експериментима.

У овој дисертацији успешно су конструисана наноантитела повезана са зеленим флуоресцентним протеином (GFP, енгл. Green Fluorescent Protein) и произведена у систему бактерије *Escherichia coli* са високим приносом експресије, који се кретао у опсегу од 2-4 mg/L културе. Пречишћена наноантитела су успешно везана на полиметакрилатни носач са ефикасношћу имобилизације од чак 99%. Током осмонедељног периода тестирања, имобилисана антитела показала су задовољавајућу стабилност у трајању од два месеца. Осмишљен је и оптимизован протокол за имуноафинитетно пречишћавање ЕВс из супернатанта ћелијске културе три различита типа ћелија (НЕК, Skbr3 и Jurkat) као и из плазме добровољних даваоца. Овом је методом омогућено брзо и лако добијање високо пречишћених везикула погодних за даље анализе. Колориметријски есеји су коришћени за потврду присуства кључних биомолекула у изолованим узорцима ЕВс (протеина и липида). Применом проточне цитометрије доказано је да изоловани ЕВс експримирају три стандардна површинска антигена CD9, CD63 и CD81. Употребом две врсте електронске микроскопије - трансмисионе (ТЕМ) и скенирајуће (SEM)- детаљно је испитана морфологија ЕВс. ТЕМ анализа је показала да изоловане везикуле имају карактеристичан „cup-shape“, што је стандардна морфолошка карактеристика ЕВс. Додатно, SEM анализа је показала да имуноафинитетна метода омогућава добијање појединачних везикула величине од 50-200 нм, без формирања агрегата. Такође је показала да су антитела способна да изолују веома хетерогену смешу ЕВс у погледу величине али доста хомогену у погледу структуре и облика. Након карактеризације ЕВс из плазме и супернатанта ћелијске културе и плазме, метода је даље унапређена, додатно оптимизована и примењена на још један биолошки извор- урин. Да би се проценила ефикасност ново-развијене методе, извршено је поређење са стандардном методом ултрацентрифугирањем. Утврђено је да ИМ успешно изолује ЕВс из урина, при чему је принос везикула нешто нижи у односу на методу „златног стандарда“ – ултрацентрифугирање. Међутим, значајна предност имуноафинитетне методе огледа се у високој чистоћи добијених узорака, што је доказано нижим концентрацијама контаминирајућих протеина и липида у поређењу са бројем везикула. Један од значајних доприноса ове дисертације је развој и оптимизација протокола за бојење ЕВс флуоресцентним бојама. Показано је да иста имуноафинитетна хроматографија може да се користи за пречишћавање али и бојење ЕВс у једном кораку. На овај се начин у једном кораку добијају обележене везикуле, ослобођене вишка боје без употребе додатних метода. Такве везикуле задржавају своју биолошку активност, што је показано њиховом успешном интернализацијом од стране Skbr3 ћелија, при чему је процес преузимања временски и концентрацијски зависан.

Резултати научно-истраживачког рада су објављени у два научна рада категорије М21. Поред тога, резултати овог рада су саопштени на четири скупа, од којих су три међународног значаја а један националног. На основу изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету

докторску дисертацију Лидије Ђ. Филиповић, под насловом „Пречишћавање екстрацелуларних везикула имуноафинитетним методама и њихова карактеризација“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, _____

КОМИСИЈА

**Др Марија Гавровић- Јанкуловић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Хемијски факултет**

**Др Радивоје Продановић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Хемијски факултет**

**Др Горан Брајушковић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет**
