

**Извештај о оцени докторске
дисертације, доставља,-**

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МФ ВМА УО

Одлуком бр. 49/111 са 111. седнице Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду одржаној 28.09.2023. године, именована је комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације (у даљем тексту Комисија) под насловом:

"Модулацијски ефекат интермитентног облика стимулације тета прасковима на оксидативно стање и активацију глије у селективно осетљивим можданим структурама на моделу стрептозотоцином изазване Алцхајмерове деменције".

Кандидат је **мастер биолог Јелена Станојевић**, студент Докторских академских студија биомедицине - модул неуронауке, МФ ВМА УО, запослена у Војномедицинској академији у Београду.

Ментор у изради тезе је научни саветник доц. др Ивана Стевановић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

Комисија у саставу:

1. Проф. др сц. мед. Милица Нинковић, Медицински факултет ВМА УО, Институт за медицинска истраживања ВМА, Београд, председник комисије;
2. Проф. др сц. мед. Ивана Стојановић, Медицински факултет Универзитета у Нишу, Ниш, члан комисије;
3. Научни сарадник др Милорад Драгић, Биолошки факултет Универзитета у Београду, Београд, члан комисије

на основу анализе приложене докторске дисертације једногласно подноси Наставно-научном већу Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација мастер биолога Јелене Станојевић написана је на 118 страна и подељена на следећа поглавља: Увод (22 стране), Хипотеза и циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (19 страна), Резултати (29 страна), Дискусија (19 страна), Закључак (две стране) и Литература (24 стране). Увод садржи четири слике, а материјал и методе једну слику, једну шему и две табеле. Резултати су приказани кроз 25 слика и графикана, а у дискусији су приказане три слике. Цитирани су подаци из 329 референци. Рад садржи и сажетак на српском и енглеском језику, садржај, биографију аутора, као и податке о Комисији, чиме по структури има све елементе докторске дисертације.

Докторски рад приказује истраживање којим се прате неуропротективни и неуромодулаторни аспекти деловања транскранијалне магнетне стимулације (ТМС) на експерименталном моделу хумане Алцхајмерове болести (АБ) након интрацеребралне апликације стрептозотоцина.

У Уводу кандидат износи податке о АБ чија етиологија је непозната, али је идентификован велики број фактора ризика који повећавају шансе за настанак и прогресију ове болести. Имајући у виду деловање инсулина и присуство инсулинских рецептора у мозгу као и нарушену инсулинску сигнализацију у АБ, уведен је експериментални модел на пацову, у коме се интрацеребровентрикуларном (ицв) применом стрептозотоцина (СТЗ) индукују биохемијске промене (смањење метаболизма глукозе, редукција холинергичке трансмисије и повећање маркера оксидативног стреса), морфолошке промене (губитак неурона, астроглиоза и неуроинфламација) и бихејвиоралне промене (оштећење учења и памћења). Микроскопском анализом ткивних исечака мозга пацијената оболелих од АБ, као и можданих структура пацова након давања СТЗ, уочавају се бројне структурне промене од којих су најзначајније формирање сенилних плакова, неурофибриларне клубади, губитак синапси, оштећење неурона и активација ћелија глије. Показано је да повећана синтеза амилоидног прекурсорског протеина модулише бројне сигналне процесе, међу којима и транскрипцију гена за протеин одговора на рани фактор раста 1 (енг. *Early Growth Response Protein 1; EGR1*), чија активност регулише ниво бета амилоида, а чија супресија пак, ублажава патологију АБ. Са друге стране, метаболички фактори који се повезују са патогенезом АБ укључују настанак и одржавање стања оксидативног стреса, запаљенских процеса, промена у метаболизму протеина и липида, смањену активност митохондрија и присуство централне инсулинске резистенције, па се може говорити о и метаболичком поремећају који постоји у току развоја АБ. Механизам деловања СТЗ управо се заснива на изазивању централне инсулинске резистенције за коју је доказано да доводи до оксидативног стреса и инфламације што доприноси развоју амилоидне и тау патологије типичне за АБ. Сматра се да је оштећење изазвано ицв применом СТЗ резултат кумулативног ефекта енергетског дефицита, смањеног обрта ацетилхолина и синаптичке дисфункције, које се код пацова клинички испољавају смањењем капацитета за учење и памћење.

У циљу ублажавања или отклањања последица оксидативног стреса, ћелије теже да успоставе редокс равнотежу стимулацијом или супресијом гена који кодирају одбрамбене ензиме, структурне протеине и факторе транскрипције. Нуклеарни фактор 2 (енг. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2*) је важан транскрипциони фактор који доприноси антиоксидативној заштити и који је стога релевантан показатељ одбрамбеног потенцијала,

посебно у условима у којима СТЗ узрокује смањење нивоа ензимских и неензимских антиоксиданата у мозгу пацова.

Примена репетитивне ТМС (рТМС) као облика неинвазивне мождане стимулације може довести до дуготрајних промена у синаптичкој пластичности моторне коре. Како неуронске мреже које осцилују тета осцилацијама боље интерферирају са тета типом „прасковите“ стимулације, у студији је коришћен облик ТМС структурисан као високофреквентан „прасак“ стимулуса са тета фреквенцом (енг. *theta burst stimulation; TBS*) интермитентног обрасца (*iTBS*) који подстиче ексцитацијску неуротрансмисију. Примена *iTBS* протокола покреће неуроресторативне ефекте регулацијом експресије неуротрофних фактора који утичу на диференцијацију, преживљавање и вијабилност неурона. Бројне студије су показале да примена *iTBS* доводи до повећања садржаја неуротрофичног фактора можданог порекла (*BDNF*) у мозгу, али и да испољава утицај и на редокс стање. Способност ТМС да смањи оксидативна оштећења подстакнута је чињеницом да ТМС повећава антиоксидативни потенцијал стимулацијом антиоксидативних, односно супримирањем прооксидативних параметара. Досадашња истраживања такође потврђују потенцијал ТМС и у бихејвиоралној и когнитивној рехабилитацији.

На основу наведених података из литературе, мастер биолог Јелена Станојевић је поставила следећу **хипотезу**:

Десетодневна примена интермитентног облика стимулације тета прасковима побољшава параметре понашања (учење и памћење) и супримира активацију глија ћелија и настанак оксидативног/ нитрозативног стреса у пречеоној можданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу на пацовском моделу Алцхајмерове деменције изазване билатералном интрацеребровентрикуларном апликацијом стрептозотоцина.

Из хипотезе су јасно дефинисани **циљеви** истраживања:

1. Изазвати експериментални модел Алцхајмерове болести (АБ) код пацова билатералном интрацеребровентрикуларном апликацијом стрептозотоцина (СТЗ);
2. На моделу АБ код пацова, испитати промене понашања (учење и памћење)- меморијски учинак, радну и референтну меморију;
3. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене интермитентног облика стимулације тета прасковима (*iTBS*) на параметре понашања (учење и памћење) - меморијски учинак, радна меморија и референтна меморија;
4. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на морфологију ћелија глије у пречеоној можданој кори и хипокампусу;
5. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на прооксидативне/ пронитрозативне параметре (супероксидни анјон радикал - $O_2^{\bullet-}$, азот оксид - $NO_2 + NO_3$), параметре оксидативног оштећења ћелијских мембрана (малондиалдехид – *MDA*) и оксидативног оштећења ДНК (8-хидрокси-2'-деоксигуанозин - *8-OHdG*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
6. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на параметре антиоксидативне заштите: активност супероксид дизмутазе (*tSOD*) и каталазе (*CAT*), концентрације глутатиона (*GSH*) и сулфхидрила (*SH* групе) и фактора регулације експресије антиоксидативних - протеина нуклеарног фактора 2 (*NRF2*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
7. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на промене у концентрацији протеина одговора на рани фактор раста 1 (*EGFR*) и амилоидних протеина

(амилоидни прекурсорски протеин - APP, β амилоид - $A\beta_{1-42}$) у пречеаној можданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу;

8. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на експресију неуротрофичног фактора можданог порекла (*BDNF*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;

9. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на експресију мембранског транспортера за ексцитаторне аминокиселине 2 (*EAAT2*) у ткиву пречеоне мождане коре и хипокампуса.

У поглављу **Материјал и методе** кандидат јасно, прецизно и детаљно представља дизајн експерименталне студије. Истраживање је спроведено као експериментална студија на животињама *in vivo*. Комплетно истраживање је урађено на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Током рада са животињама поштовани су етички принципи рада на лабораторијским животињама Војномедицинске академије у Београду, као и Закон о заштити животиња („Службени гласник РС“, број 41/09), који су у складу са правилима Директиве европског парламента о заштити животиња коришћених за научне сврхе 2010/63/EU од 22.09.2010. године. Експеримент је одобрен од стране Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управе за ветерину (број 323-07-08358/2020-05).

Студијски узорак је израчунат помоћу комерцијално доступног програма *GPower 3.1.*, за вероватноћу грешке типа I ($\alpha = 0,05$) и снагу студије $>80\%$. Узимајући у обзир дизајн студије, значајност разлике унутар и између група, уз нормалну расподелу праћених параметара, утврђена је применом различитих модалитета анализе варијансе. Уз очекивану високу разлику вредности између пет експерименталних група (јачина ефекта 0,4), број јединки у свакој појединачној групи је био 13.

Добијене вредности су презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности су коришћени тестови: једносмерна анализа варијансе (ANOVA) са поновљеним мерењима и независни Студентов *t* тест за обележја са нормалном расподелом, као и *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови за непараметарска обележја. За тестирање зависности између појединих варијабли коришћен је тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање *Pearson*-овог коефицијента корелације. Статистичка обрада добијених резултата вршена је помоћу комерцијалног програмског пакета *GraphPad Prism 9.00*. Статистичка значајност је одређена на $p < 0,05$.

У поглављу **Резултати**, кроз 25 слика и графикана детаљно су приказани резултати бихејвиоралних промена- теста ротирајућег цилиндра и тестова у зракастом лавиринту, као и структурних промена- хистохемијске анализе можданих пресека и имунохистохемијске експримираности јонизујућег калцијум-везујућег адапторног молекула (*Iba1*), глијалног фибриларног киселог протеина (*GFAP*), виментина и транспортера ексцитаторних аминокиселина 2. Резултати функционалних промена у можданим структурама приказани су кроз производњу супероксидног анјона, садржај нитрата и нитрита, садржај тиобарбитурна киселина (ТВА)-реагујућих супстанци, концентрацију 8-хидрокси-2'-деоксигуанозина, активност укупне супероксид дисмутазе, активност каталазе, садржај сулфхидрилних група, концентрацију укупног глутатиона, активност *NRF2*, концентрацију амилоидног прекурсорског протеина, концентрацију β амилоида, *EGR1* и *BDNF*.

Дискусија је написана јасно и прегледно уз упоредни приказ познатих података из релевантних публикованих радова и добијених резултата из докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважнија сазнања која су проистекла из добијених резултата.

У литератури је наведено 329 референци које су цитиране у тексту дисертације.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Резултати докторске дисертације, у складу са постављеним циљевима истраживања, довели су до сазнања о томе да:

1. Интрацеребровентрикуларна (ицв) апликација СТЗ (једнократно, 3 mg/kg) 30 дана након примене не доводи до промена моторне координације и равнотеже код *Wistar* пацова;

2. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ оштећује параметре понашања (учење и памћење; меморијски учинак, радну и референтну меморију), док десетодневна примена *iTBS* побољшава поменуте параметре код *Wistar* пацова;

3. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до благих морфолошких промена неурона у региону *CA3* вентралног хипокампуса, перивентрикуларној области, каудопутамену и медијалној хабенули *Wistar* пацова;

4. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећане имунореактивности *Iba+* ћелија, док десетодневна примена *iTBS* смањује микроглиозу у *gyrus dentatus*, фимбрији, *CA1* региону дорзалног хипокампуса, медијалној хабенули, пречеоној можданој кори и каудопутамену *Wistar* пацова;

5. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ узрокује благо до умерено повећање имунореактивности *GFAP+ / VIM+* ћелија, док десетодневна примена *iTBS* смањује астроглиозу у хипокампусу, фимбрији и перивентрикуларној области каудопутамена *Wistar* пацова;

6. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећаног стварања прооксидативних и пронитрозативних параметара, док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова;

7. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећања оксидативног оштећења ћелијских мембрана и оксидативног оштећења ДНК, док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума и малог мозга *Wistar* пацова;

8. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до смањења параметара антиоксидативне заштите као и *NRF2*, док десетодневна примена *iTBS* повећава поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова;

9. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећања концентрације *EGR1* и амилоидних протеина, док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре и стријатума *Wistar* пацова;

10. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до смањења експресије *BDNF*, док десетодневна примена *iTBS* повећава овај секреторни протеин у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова;

11. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ нема утицај на експресију мембранског транспортера за ексцитаторне аминокиселине 2 (*EAAT2*), као ни десетодневна примена *iTBS* у ткиву пречеоне мождане коре и хипокампуса *Wistar* пацова.

В) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

У поглављу Дискусија докторанд садржајно и критички сагледава резултате у складу са постојећим сазнањима добијеним анализом података из литературе из области примене ТМС на експерименталном моделу хумане АБ изазване интрацеребралном апликацијом стрептозотоцина код *Wistar* пацова. Начин писања дискусије и примењени аргументи, јасно показују да мастер биолог Јелена Станојевић у потпуности влада проблематиком области којом се бави тема докторске дисертације.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације доприносе детаљнијем сагледавању молекулских механизма потенцијалног терапијског деловања десетодневне примене *iTBS* након давања стрептозотоцина. Праћењем бихејвиоралних параметара добио се прецизан увид у процену оштећења когнитивних функција животиња, док је степен активације глија ћелија указао на морфолошко и функционално ремоделирање покренуто поновљеном применом *iTBS* на овом експерименталном моделу. Такође, резултати спроведене студије пружају прецизније податке о редокс стању и степену метаболичких промена у селективно осетљивим структурама мозга са крајњим циљем увођења *iTBS* протокола у комбиновану терапију са фармаколошким средствима, чиме би се побољшала перспектива лечења различитих поремећаја нервног система код људи.

Г) Објављени радови из ове докторске тезе

1. Stanojevic J, Dragic M, Stevanovic I, Ilic T, Stojanovic I, Zeljkovic M, Ninkovic M. Intermittent theta burst stimulation ameliorates cognitive impairment and hippocampal gliosis in the Streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease. *Behavioral Brain Research* 2022; 433:113984 (M22; IF=3.352) - (рад објављен пре одлуке Сената УО);

2. Stanojevic J, Zeljkovic M, Dragic M, Stojanovic I, Ilic T, Stevanovic I, Ninkovic M. Intermittent theta burst stimulation attenuates oxidative stress and reactive astrogliosis in the Streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease-like pathology. *Front Aging Neurosci* 2023. (M21; IF=5,702) - (рад публикован након одлуке Сената УО).

Д) Закључак и предлог

Кандидат мастер биолог Јелена Станојевић испуњава све услове дефинисане Чланом 7. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука ("Службени војни лист", бр. 20/12; 25/13 и 12/16), што обухвата написану докторску дисертацију и публикована два рада у часописима категорије М21 (IF=7,702) и М22 (IF=3.352) у оквиру докторске тезе у којима је кандидат први аутор.

Докторска дисертација под називом "**Модулацијски ефекат интермитентног облика стимулације тета прасковима на оксидативно стање и активацију глије у селективно осетљивим можданим структурама на моделу стрептозотоцином изазване Алцхајмерове деменције**" представља оригиналан и актуелан научни рад из области неуронаука.

Истраживање је спроведено са свим начелима етичког приступа и научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито.

Добијени резултати представљају значајан допринос фундаменталним сазнањима о функционалним субцелуларним променама након примене *iTBS* протокола на моделу хумане АБ са СТЗ, са аспекта праћења бихејвиоралних параметара, степена активације глија ћелија, као и оксидативног стања и степена метаболичких промена у селективно осетљивим структурама мозга.

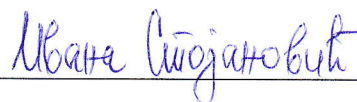
На основу изнетог, а имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, Комисија закључује да докторска дисертација мастер биолога Јелене Станојевић испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква представља значајан допринос проучавању у датој области. Будући да кандидаткиња испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске дисертације, Комисија предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду да овај рад прихвати као завршену докторску дисертацију мастер биолога Јелене Станојевић и омогући његову јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 13.11.2023.

проф. др Милица Нинковић, председник



проф. др Ивана Стојановић, члан



научни сарадник др Милорад Драгић, члан

