

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 08.04.2022. године, на основу молбе ментора, др Данијеле Батавељић, научног сарадника Универзитета у Београду – Биолошког факултета, и др Павла Анђуса, редовног професора Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Мине И. Перић**, вишег стручног сарадника Универзитета у Београду – Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, под насловом: **„Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој мождини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе”**, у саставу: академик Милена Стевановић, научни саветник Универзитета у Београду – Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство; редовни професор Универзитета у Београду – Биолошког факултета, др Данијела Лакета, ванредни професор Универзитета у Београду – Биолошког факултета, др Љиљана Николић, виши научни сарадник Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију и др Милош Бркушанин, научни сарадник Универзитета у Београду – Биолошког факултета.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Мине И. Перић под насловом „Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој мождини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе“ урађена је у Центру за ласерску микроскопију – Института за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“, уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије и институционалних пројеката под евиденционим бројевима 451-03-9/2021-14/200178 и 451-03-9/2021-14/200007.

Докторска дисертација садржи 112 страна. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (23 стране), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (11 страна), Резултати (18 страна), Дискусија (12 страна), Закључци (1 страна), Литература (30 страна, 504 библиографске јединице). Дисертација садржи 24 слике (6 слика у поглављу Увод, 17 слика у поглављу Резултати и 1 слика у поглављу Дискусија) и 4 табеле у поглављу Материјал и методе. Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) елементе са неопходним информацијама о докторској дисертацији: Насловну страницу на српском језику, Насловну страницу на енглеском

језику, Страницу са информацијама о менторима, члановима комисије и датумом одбране, Страницу са информацијама о финансирању и изјавама захвалности, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику, Листу скраћеница и Садржај. На крају докторске дисертације се налазе Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Уводно поглавље докторске дисертације кандидаткиње је подељено у четири целине у којима је дат преглед досадашњих сазнања из литературе која се тичу проблематике докторске дисертације. У оквиру прве целине дат је преглед одлика и генетичких узрочника амиотрофичне латералне склерозе (АЛС) као и опис карактеристика испитиваног пацовског модела ове болести који одликује прекомерна експресија хумане мутиране супероксид дисмутазе 1 (hSOD1^{G93A}). У другој целини описане су одлике и механизми болести релевантни за тему докторске дисертације, међу којима су посебно истакнути појава формирања агрегата мутираног протеина супероксид дисмутазе 1 (SOD1), затим механизми независни од типа ћелија и неуроинфламација. Кандидаткиња је такође дала детаљан опис улоге микроглије, астроцита и олигодендроцита у физиолошким и патофизиолошким процесима у нервном систему. У трећем поглављу дат је преглед литературе о интеракцији олигодендроцита и микроглије и њиховом значају у физиолошким функцијама централног нервног система (ЦНС). У четвртом поглављу је детаљно описан значај, као и механизми укључени у одржавање хомеостазе K⁺ у ЦНС и посебно су истакнуте одлике улазно-исправљачког калијумовог канала (Kir4.1).

У следећем поглављу **Циљеви истраживања**, концизно је дефинисано 7 научних циљева како би се испитале одлике олигодендроцита и микроглије и њихове улоге у одржавању хомеостазе K⁺ у АЛС:

1. Испитати експресију Kir4.1 у олигодендроцитима у симптоматској фази болести у кичменој моздини пацовског hSOD1^{G93A} модела АЛС
2. Испитати морфолошке промене олигодендроцита у кичменој моздини hSOD1^{G93A} пацова
3. Истражити експресију и функционална својства Kir4.1 канала у олигодендроцитима у култури
4. Испитати морфолошке промене микроглије у АЛС и њену склоност ка формирању кластера ћелија у кичменој моздини hSOD1^{G93A} пацова
5. Испитати присуство протеинских маркера АЛС у кластерима микроглије
6. Испитати фагоцитне маркере у појединачној и микроглији груписаној у кластере ћелија у кичменој моздини hSOD1^{G93A} пацова
7. Истражити биофизичке карактеристике микроглије у култури изолованој из кичмене моздине hSOD1^{G93A} пацова

У поглављу под називом **Материјал и методе** кандидаткиња детаљно описује све хемикалије, протоколе и истраживачке методе коришћене у изради експеримената у оквиру ове докторске дисертације. Приказан је детаљан опис коришћеног

експерименталног модела, као и припреме испитиваних примарних ћелијских култура. Кандидаткиња је применила молекуларно-биолошке методе, методе имунофлуоресцентног обележавања ткивних пресека, конфокалне микроскопије, имуноблота као и електрофизиолошке методе. Кандидаткиња је добијене резултате анализирала применом одговарајућих статистичких тестова. У првом делу овог поглавља дат је табеларни приказ свих коришћених хемикалија, раствора, пуфера и медијума. Затим је детаљно описан експериментални модел hSOD1^{G93A} пацова, почевши од протокола за утврђивања присуства трансгена, а потом описа појаве симптома АЛС, прогресије болести и временских тачака у којима је узорковано ткиво за даље експерименте. Детаљно су приказани протоколи припреме примарних култура неонаталних олигодендроцита и неонаталне и адултне микроглије. Кандидаткиња затим описује протоколе изолације мијелина из ткива експерименталних животиња који су потом испитани применом описане методе имуноблота. Потом је дат детаљан протокол имунофлуоресцентног обележавања ткивних пресека и листа коришћених примарних и секундарних антитела. Кандидаткиња детаљно описује параметре снимања микрографија коришћењем конфокалног микроскопа, као и протоколе квантитативне анализе добијених микрографија. Такође, кандидаткиња описује електрофизиолошке протоколе за регистрацију струјних профила примарних олигодендроцита и микроглије у култури, као и приступ у анализи различитих биофизичких параметара.

У оквиру поглавља **Резултати**, кандидаткиња је у оквиру две тематске целине систематично и концизно представила резултате своје докторске дисертације. Резултати су поткрепљени одговарајућим композитним сликама које садрже јасно обележене репрезентативне конфокалне микрографије, примере струјних записа и графичке приказе одговарајућих квантитативних анализа. У првој целини представљени су резултати који показују нарушене карактеристике олигодендроцита у АЛС. Применом имунофлуоресцентног обележавања пресека кичмене мождине, потом конфокалне микроскопије и анализом колокализације и корелације маркера олигодендроцита и Kir4.1 канала показана је смањена експресија Kir4.1 канала у олигодендроцитима у вентралним роговима лумбалног и цервикалног региона кичмене мождине симптоматских hSOD1^{G93A} пацова. Применом имуноблот методе кандидаткиња је показала да је експресија Kir4.1 смањена у мијелинској фракцији изолованој из кичмене мождине симптоматских АЛС животиња. Такође, показано је да олигодендроците у вентралним роговима АЛС пацова одликује издужени облик нуклеуса што је предложено као морфолошки индикатор дегенерације ових глијских ћелија. Кандидаткиња је показала смањену експресију Kir4.1 у премијелинизујућим олигодендроцитима у култури изолованим из hSOD1^{G93A} пацова. Овај податак је праћен и смањеном амплитудом улазних струја у АЛС олигодендроцитима као и њиховом смањеном активношћу у одговору на повећање концентрације ванћелијског K⁺. Применом баријум хлорида који инхибира Kir струје, кандидаткиња је показала смањење Kir струја у hSOD1^{G93A} олигодендроцитима.

У другој целини резултата приказане су одлике микроглије у патолошким процесима у кичменој мождини АЛС модела. У вентралним роговима лумбалног региона кичмене мождине кандидаткиња је показала да се формирају региони изражене

експресије Kir4.1 у пресимптоматској и симптоматској фази АЛС. Двоструким имунофлуоресцентним обележавањем показано је да кластере Kir4.1 одликује присуство ћелија микроглије. Кандидаткиња је показала да Iba1⁺ микроглију у кичменој моздини АЛС пацова одликује измењена морфологија која указује на активiranу форму ових ћелија. Kir4.1⁺/Iba1⁺ кластери уочавају се у вентралним роговима где су локализовани и моторни неурони који дегенеришу у АЛС, а број ових кластера се повећава са прогресијом болести. Уз помоћ троструког имунофлуоресцентног обележавања кандидаткиња је показала да кластере Kir4.1⁺/Iba1⁺ ћелија одликује присуство агрегата мутиране форме SOD1 која представља патолошку карактеристику АЛС. Такође, кандидаткиња је показала да микроглија у кластерима показује повећано присуство маркера активације и фагоцитних везикула. Електрофизиолошким испитивањем микроглије изоловане из неонаталних пацова није уочена разлика између основних својстава неонаталне АЛС и контролне микроглије. Како фенотип и својства микроглије зависе од утицаја микросредине која је измењена у неуроинфламацији у АЛС, кандидаткиња је испитала и биофизичка својства микроглије изоловане из кичмене моздине симптоматских АЛС пацова и показала смањење Kir-зависних струја у АЛС микроглији у односу на контролне ћелије.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња је дала критички осврт на резултате докторске дисертације у контексту литературних података. Кандидаткиња је систематично обрадила и дискутовала све добијене резултате у контексту познатих литературних података у вези са АЛС, али и другим неуродегенеративним болестима. Кандидаткиња је указала на допринос описаних промена у глијским ћелијама актуелним научним сазнањима о неуродегенеративним процесима у АЛС и истакла Kir4.1 калијумов канал као потенцијални биомаркер од значаја код терапије АЛС.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња је изнела концизне закључке произашле из анализе резултата њене докторске дисертације:

1. Олигодендроцити у кичменој моздини АЛС пацова имају измењену морфологију коју одликује издужен облик нуклеуса. Иако АЛС није примарно демјелинизујућа болест, резултати ове тезе показују да постоје дегенеративне промене у овим ћелијама глије, те да специфична измењена форма нуклеуса може представљати нови индикатор дегенерације олигодендроцита.
2. Редукована експресија Kir4.1 канала у вентралним роговима и мијелину кичмене моздине, заједно са нарушеном функцијом овог канала у олигодендроцитима, указује на нарушено уклањање K⁺ након активности неурона што потенцијално доприноси дегенерацији моторних неурона у АЛС.
3. У вентралним роговима лумбалног региона кичмене моздине формирају се кластери ћелија који задржавају Kir4.1 имунореактивност у пресимптоматској и симптоматској фази АЛС упркос редукцији експресије Kir4.1 у остатку сиве масе.
4. Kir4.1 позитивне кластере одликује изражено присуство микроглије. Овај налаз указује на специфичну редистрибуцију експресије Kir4.1 у процесу неуроинфламације у АЛС.

5. У пресимптоматској и симптоматској фази болести у вентралним роговима АЛС кичмене мождине у Kir4.1⁺/Iba1⁺ кластерима су присутни агрегати мутиране SOD1 што може указати да се Kir4.1⁺/Iba1⁺ кластери формирају на местима одумирања моторних неурона.
6. Културу микроглије изоловану из неонаталних АЛС и контролних животиња одликују слична електрофизиолошка својства, док се ћелије микроглије изоловане из адултне кичмене мождине симптоматских АЛС пацова одликују редукованим Kir струјама.

На основу добијених резултата и изведених појединачних закључака кандидаткиња је извела и један општи закључак:

Ћелије глије, олигодендроците и микроглију, одликују промењена својства у процесима неуродегенерације у АЛС које указују на њихову улогу у комплексним интеракцијама у прогресији болести. Промене експресије Kir4.1 и његов значај у физиолошким и патолошким процесима, истичу овај протеин као потенцијално место испитивања и деловања у циљу разумевања механизма у основи патофизиолошких промена у амиотрофичној латералној склерози.

У поглављу **Литература** кандидаткиња је приказала 504 библиографске јединице које су на адекватан начин цитиране при писању дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. радови у часописима међународног значаја

1. Peric, M., Nikolic, L., Andjus, P. R., & Bataveljic, D. (2021). Dysfunction of oligodendrocyte inwardly rectifying potassium channel in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 54(7), 6339–6354. <https://doi.org/10.1111/ejn.15451>. **M22** (Neurosciences 158/273), IF₂₀₂₀=3.386 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34510584/>
2. Perić, M., Bataveljić, D., Bijelić, D., Milićević, K., Andjus, P. R., Bogdanović Pristov, J., & Nikolić, L. (2022). Approach for patch-clamping using an upright microscope with z-axis movable stage. *Microscopy research and technique*, 10.1002/jemt.24066. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/jemt.24066>. **M21** (4/21 Anatomy & Morphology), IF₂₀₂₀=2.769 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35088507/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Peric, M., Nikolic, Lj., Andjus, P., Bataveljic, D. Dysfunction of oligodendrocyte inwardly rectifying potassium channel in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. Nov 24th - 25th 2020, 3rd Symposium on Physiology & Pathology of Neuroglia (Online), #W05. **M34**
2. Perić, M., Bataveljić, D., Andjus, P.R. 2019. Changed expression of potassium rectifying channel in glial cells in spinal cord of the ALS rat model. SfN meeting Oct 19-23, Chicago, IL, USA. # 566.12/F20. **M34**

3. Perić, M., Bataveljić, D., Andjus, P.R. 2018. Expression of inwardly rectifying potassium channel in microglial cells in the spinal cord of hSODG93A rat ALS model, 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, F18-3542. **M34**
4. Peric, M., Bataveljic, D., Andjus, P.R. "Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 in microglial cell clusters in the hSODG93A rat model." European Network to Cure ALS Meeting ENCALS, 18-20 May, 2017, Book of abstracts p22 or p144. **M34**
5. Perić, M., Bataveljić, D., Andjus, P.R. 2017. Imaging the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 in microglial cell clusters in the spinal cord of an ALS rat model, European Society for Molecular Imaging Meeting, Cologne, # PW 20/203. **M34**
6. Peric, M., Andjus, P., Bataveljic, D. "Expression of Kir4.1 channel in spinal cord oligodendrocytes of the ALS rat model." XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 15 – 18, 2015, Bilbao, Spain, Abstract book, Glia, Volume 63, Issue Supplement S1, p. E148-149. **M34**
7. Bataveljic, D., Nikolic, Lj., Peric, M., Andjus, P.R. "Expression and function of inwardly rectifying potassium channel in ALS oligodendrocytes." 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, March 18 – 21 2015, Gottingen, Germany, Proceedings p. 153. **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Мине И. Перић, Б3022/2014 послата је дана 04/04/2022. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности је достављен менторима истог дана 04/04/2022. године.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација (у даљем тексту Правилник) чија се одбрана организује на Универзитету у Београду и налаза у Извештају из програма *iThenticate* (у даљем тексту Извештај) којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој моздини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе“, аутора Мине И. Перић, констатујемо да утврђено подударане текста износи 10%. Увидом у Извештај, утврђено је да постоји подударане са 91 сумарним извором. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је подударане са три извора било 1% и у свим преосталим случајевима мање од 1%. Овај степен подударности је последица присутних термина у претходно публикованим резултатима из исте области истраживања, и то пре свега у опште прихваћеним фразама, затим подударане 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.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Мине И. Перић, под насловом „Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој моздини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе“, те се прописани поступак припреме за одбрану њене докторске дисертације може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију Мине И. Перић, као и у научне публикације проистекле из резултата ове докторске дисертације, Комисија закључује да ова докторска дисертација представља оригинални научни допринос у разумевању улоге глијских ћелија у неуродегенеративним процесима код АЛС. Приказани резултати јасно показују значај морфолошких и физиолошких промена како олигодендроцита, тако и микроглије у патогенези АЛС. Поред тога, докторска дисертација Мине И. Перић указује да Kir4.1 у глијским ћелијама може бити потенцијалан биомаркер АЛС. Имајући све то у виду, резултати приказани у овој докторској дисертацији имају и потенцијални транслациони значај у погледу унапређења постојећих као и креирања нових терапеутских стратегија за лечење АЛС. Сумарно, Комисија сматра да ова докторска дисертација представља оригинални научни допринос у области неуродегенерације и неуроинфламације и да доприноси разумевању улоге глијских ћелија, посебно у погледу хомеостазе калијума, у неуродегенеративним патологијама праћеним неуроинфламацијом.

Имајући у виду претходно наведено Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију под насловом „**Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој моздини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе**“, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета да овај извештај прихвати и проследи га Већу области природних наука Универзитета у Београду на усвајање.

КОМИСИЈА:

У Београду, 12.04.2022. године

Академик Милена Стевановић, редовни професор и научни саветник
Српска академија наука и уметности - САНУ
Универзитет у Београду - Биолошки факултет
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

др Данијела Лакета, ванредни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Љиљана Николић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“, Институт од
националног значаја за Републику Србију

др Милош Бркушанин, научни сарадник
Универзитет у Београду - Биолошки факултет