

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U  
BEOGRADU**

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu od 24.06.2019. godine za ocenu doktorske disertacije pod nazivom „Ispitivanje protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u modelu neuroinflamacije kod pacova“, kandidata Jelene Tasić, određena je komisija u sastavu:

1. Prof. dr Dušan Popadić - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Željka Stanojević - Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Vladislav Volarević - Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
5. N.sar.dr Verica Paunović - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. VNS. dr Svetlana Jovanović Vučetić - Institut za nuklearne nauke Vinča, Beograd

Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Aleksandra Isaković a komentor prof. dr Vladimir Trajković.

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, članovi komisije Naučnom veću Medicinskog fakulteta u Beogradu jednoglasno podnose sledeći

# IZVEŠTAJ

## A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija „Ispitivanje protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačkaka u modelu neuroinflamacije kod pacova“ sadrži sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i Metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. Disertacija je napisana na 95 strana, sadrži 22 slike, 9 tabela i 1 šemu. U posljednjem poglavlju je prikazan pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 209 navoda.

U **uvodu** su opisane različite vrste ugljeničnih nanočestica koje su predmet brojnih naučnih istraživanja. Sažeto su prikazani njihovi biološki efekti koji zavise, pre svega, od načina sinteze i fizičko hemijskih svojstava nanočestica. S obzirom na to da je istraživanje sprovedeno na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE), koji je jedan od najčešće korišćenih animalnih modela neuroinflamacije, kandidat je opisao ovaj eksperimentalni model, različite načine njegovog indukovanja i prikazao glavne molekularne mehanizme koji se nalaze u osnovi imunopatogeneze bolesti. S tim u vezi istaknut je značaj T ćelijskih subpopulacija (posebno Th1 i Th17 limfocita) koje doprinose razvoju inflamacije i oštećenju centralnog nervnog sistema (CNS). Na kraju uvoda, kratko je opisan je i uzajamni odnos inflamacije, oksidativnog stresa, apoptoze i autofagije kao procesa koji se međusobno uslovljavaju i doprinose razvoju neuroinflamacije ali i oštećenjima koja nastaju u sklopu ovog fenomena.

**Ciljevi istraživanja** su jasno definisani: ispitivanje efekta grafenskih kvantnih tačkaka (GKT) na klinički tok bolesti i inflamaciju CNS u modelu EAE uz detaljno ispitivanje celularnih i molekularnih mehanizma njihovog potencijalnog povoljnog dejstva u EAE.

Poglavlje **materijal i metode**, koje je napisano na 22 strane i obuhvata 1 šemu i 5 tabela, se može podeliti na tri celine. U prvoj celini su objašnjeni načini pripreme različitih ugljeničnih nanočestica korišćenih u daljim eksperimentima. U drugoj celini su prikazani detalji *in vivo* modela EAE: način indukcije EAE, procena kliničkih znakova bolesti, tretman eksperimentalnih životinja kao i uzorkovanje tkiva za potrebe daljih ispitivanja. Nakon toga su opisani različiti histološki pristupi kojima je ispitivano prisustvo limfocitnih infiltrata i apoptoze unutar CNS, demijelinizacija i ultrastrukturalna analiza ćelija i tkiva. Metodom protočne citofluorimetrije je vršena fenotipska karakterizacija izolovanih mononuklearnih ćelija a nivo ekspresije gena za medijatore inflamacije je određen primenom qPCR metode. Aktivnost proteina koji učestvuju u signalnom putu autofagije, kao i Akt i MAPK signalnom putu, je ispitana imunoblotom u homogenatima tkiva. Treća celina je obuhvatila *in vitro* eksperimente

kojima je ispitivan efekat GKT na komercijalnim i primarnim kulturama oligodendrocita (OLN93) i neurona (PC12). U okviru ove celine opisan je postupak izolacije, uspostavljanja i kultivisanja primarnih kultura oligodendrocita i neurona pacova, dozno zavistan tretman OLN93 i PC12 ćelija sa GKT, model kokultivacije komercijalnih i primarnih oligodendrocita i neurona sa T limfocitima stimuliranim sa ConA kao i tretman komercijalnih i primarnih oligodendrocita i neurona sa medijumom prethodno stimuliranih T limfocita. U statističkoj obradi podataka, za poređenje rezultata dobijenih za nezavisne uzorke korišćen je parametarski – Studentov t-test ili jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey testom ili Chi-square testom. Vrednosti  $p < 0,05$  smatrane su statistički značajnim.

U poglavlju **rezultati**, na 26 strana, su detaljno i jasno opisani svi dobijeni rezultati koji su prikazani na 20 slika i 4 tabele .

**Diskusija** je napisana na 10 strana, pri čemu su rezultati ovog istraživanja razmatrani i tumačeni u skladu sa podacima iz literature.

U poglavlju **zaključak** kandidatkinja je iz svojih rezultata izvela jasne i nedvosmislene zaključke, koji su u potpunosti odgovorili na postavljene ciljeve istraživanja.

U poglavlju **literatura** navedeno je 209 referenci koje su u disertaciji citirane vankuverskim stilom.

## **B. Opis postignutih rezultata**

U rezultatima ovog istraživanja su najpre okarakterisane različite vrste ugljeničnih nanočestica: fulerenoli, grafen oksid (GO), karbonske kvantne tačke (KKT) i grafenske kvantne tačke dobijene različitim postupcima (GKT-GR i GKT-LK). Primenom ugljeničnih nanočestica u modelu EAE je najpre pokazano da one ne ispoljavaju toksičnost niti efekte koji bi mogli da interferiraju sa kliničkim znacima EAE, što je omogućilo njihovo dalje ispitivanje. Ispitujući njihov uticaj na klinički tok EAE je zaključeno da fulerenoli, KKT i GO ne ostvaruju efekat na klinički tok bolesti dok GKT-LK i GKT-GR značajno smanjuju kliničke manifestacije EAE u više vremenskih tačaka. Analizom dobijenih rezultata je zaključeno da GKT-GR imaju najizraženije protektivno dejstvo. Dodatnim analizama je pokazano da GKT-GR odlažu pojavu bolesti i značajno smanjuju kumulativni i maksimalni klinički skor. U narednim eksperimentima su ispitivani celularni i molekularni mehanizmi protektivnog dejstva GKT-GR (u daljem tekstu GKT). Kako bi detaljnije ispitali u kojoj fazi bolesti tretman ostvaruje najpotentniji efekat, GKT su aplikovane tokom induktivne ili efektorske ili obe faze bolesti. Najbolji efekat je ostvaren aplikacijom

tretmana kroz sve faze bolesti, gde se beleži i znatno manja redukcija telesne mase u odnosu na netretirane, imunizovane životinje. U skladu sa povoljnim efektom na klinički tok bolesti, pokazano je da GKT smanjuju nakupljanje mononuklearnih infiltrata u kičmenoj moždini (KM) imunizovanih pacova, smanjuju procenat apoptotičnih ćelija i demijelinizaciju CNS. Smanjen stepen demijelinizacije je potvrđen prisustvom većeg procenta normalnih uz smanjenje procenta oštećenih i nemijelinizovanih aksona, u odnosu na grupu netretiranih, imunizovanih životinja. U uzorcima mononuklearnih ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova i tkiva KM je pokazana smanjena procentualna zastupljenost CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T ćelija kao i ekspresija iRNK za IFN- $\gamma$ , njegov transkripcioni faktor T-bet, kao i druge medijatore inflamacije (TNF, IL-1 $\beta$  i GM-CSF) što govori u prilog inhibicije Th1 ćelijskog odgovora. Time je pokazano da GKT ostvaruju antiinflamatorni efekat tokom induktivne i efektorske faze bolesti Takođe, u homogenatima drenirajućih limfnih čvorova i KM je pokazano da GKT aktiviraju MAPK i Akt signalne puteve i modulišu signalni put autofagije.

Kako bi bolje razumeli mehanizam delovanja GKT, primenom TEM je najpre ispitana sposobnost njihove akumulacije u tkivu i ćelijama imunskog sistema i CNS. Nakon sedmodnevnog tretmana zapažena je akumulacija GKT u limfocitima drenirajućeg limfnog čvora, dok su nakon četrnaestodnevnog tretmana GKT bile prisutne i u mijelinu, glijalnim ćelijama i aksoplazmi neurona. Ćelijska internalizacija GKT je pokazana i u *in vitro* uslovima na izolovanim limfocitima, kao i ćelijama kulture oligodendrocita (OLN93) i neurona (PC12). Citoprotektivno dejstvo GKT je pokazano i na OLN93 i PC12 ćelijama koje su kokultivisane sa ConA stimulisanim T limfocitima, dok je direktan citoprotektivan efekat na ćelijama CNS pokazan na primarnim i komercijalnim ćelijama oligodendrocita i neurona koji su tretirani sa medijumom prethodno stimulisanih T limfocita. Pored citoprotektivnog , tretman izolovanih ConA stimulisanih limfocita sa GKT je doveo do smanjene ekspresije iRNK za medijatore Th1 ćelijskog odgovora (IFN- $\gamma$  i T-bet) i Th17 transkripcioni faktor ROR- $\gamma$ t, kao i proinflamatorne citokine TNF, GM-CSF i IL-1 $\beta$ , u odnosu na ConA stimulisane kontrolne limfocite što je potvrdilo i anti-inflamatorno dejstvo GKT. Iz svega navedenog, može se zaključiti da GKT ispoljavaju anti-inflamatorno neuroprotektivno dejstvo u imunski posredovanom oštećenju CNS u EAE modelu.

### **C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima literature**

Korišćenjem animalnog modela neuroinflamacije, EAE, koji se često koristi i za proučavanje imunopatogeneze multiple skleroze (MS), po prvi put je pokazana sposobnost GKT-GR da deluju anti-inflamatorno i smanje oštećenja CNS. Biološki

efekti ugljeničnih i drugih nanočestica su predmet brojnih istraživanja. Poznato je da njihove fizičko-hemijske osobine određuju njihov biološki efekat pa, u skladu sa time, fulerenol, GO i KKT nisu ostvarile nikakav efekat na animalnom modelu EAE, dok su GKT značajno ublažile kliničko ispoljavanje bolesti. Poznato je da nanočestice manjih dimenzija i pozitivnog naelektrisanja znatno brže i u većem broju ulaze u ćelije, što je jasno pokazano na primeru GKT koje su akumulirane u tkivima i ćelijama limfnog sistema i CNS. Zahvaljujući svojim malim dimenzijama one imaju sposobnost prolaska kroz krvno moždanu barijeru. U skladu sa time, GKT su smanjile limfocitnu infiltraciju, apoptozu oligodendrocita i posledično redukovale demijelinizaciju.

Selekcija potencijalnih terapeutika za MS se uglavnom zasniva na sposobnosti jedinjenja od interesa da smanji kliničko ispoljavanje EAE u uslovima njihove aplikacije posle pojave prvih simptoma bolesti. Prema tome, ne treba zanemariti efekat GKT na aktivaciju limfocita tokom induktivne faze bolesti, jer se pojava relapsa kod MS pacijenata vezuje upravo za aktivaciju naizgled neaktivnih T limfocita u perifernoj krvi. Ovo je u skladu sa sposobnošću GKT da značajno smanje učestalost relapsa u EAE modelu u ovoj studiji. Takođe, pokazano smanjenje limfocitne infiltracije CNS bi moglo da doprinese smanjenju učestalosti relapsa u EAE modelu.

Ispitujući molekularne mehanizme koji je nalaze u osnovi imunopatogeneze EAE, brojne studije ukazuju na značaj Th1 i Th17 ćelijskog odgovora. U skladu sa literaturnim podacima koji govore o ulozi IFN- $\gamma$  u indukciji EAE, GKT su suprimirale ekspresiju IFN- $\gamma$  i njegovog transkripcionog faktora (T-bet) tokom induktivne i efektorske faze bolesti, što korelira sa odloženim početkom bolesti i blažom kliničkom slikom EAE u ovom istraživanju. Ovi rezultati su u skladu i sa prethodnim ispitivanjima antiinflamatornog efekta GKT *in vitro*, u kojima je pokazano da GKT umanjuju sposobnost humanih dendritskih ćelija da usmere T ćelijski odgovor u Th1 pravcu. Slično tome, primena GKT na modelu autoimunskog hepatitisa je dovela do inhibicije Th1 ćelijskog odgovora. Sa druge strane, izostanak efekta GKT na Th17 ćelijski odgovor u ovoj studiji može biti objašnjen rezultatima drugih studija koje su pokazale da IFN- $\gamma$  inhibira produkciju IL-17. Poznato je da proinflamatorni citokini, poput TNF, povećavaju propustljivost krvno-moždane barijere. U ovom istraživanju je pokazana sposobnost GKT da inhibiraju gensku ekspresiju i produkciju klasičnih proinflamatornih citokina TNF i IL-1 $\beta$  (*in vitro* i *in vivo*) što može biti osnovni mehanizam kojim GKT smanjuju infiltraciju encefalitogenih ćelija u CNS imunizovanih životinja. Za razliku od rezultata dobijenih u okviru *in vivo* dela istraživanja, u uslovima *in vitro* je pokazana veća osetljivost Th17 ćelija na GKT tretman, verovatno kao rezultat mnogostruko veće lokalne koncentracije GKT.

Jedan od važnih zaključaka ovog istraživanja jeste sposobnost GKT da inhibira apoptozu oligodendrocita i time ispolji povoljan efekat sprečavanjem

demijelinizacije. Imajući u vidu da je apoptoza oligodendrocita indukovana vezivanjem TNF za svoj receptor (TNFR1) kao i to da je citotoksično dejstvo IFN- $\gamma$  pokazano na oligodendrocitnim progenitorskim ćelijama, inhibicija produkcije TNF i IFN- $\gamma$  predstavlja važan mehanizam anti-apoptotskog dejstva GKT tretmana koji je pokazan u ovom istraživanju.

Opisana sposobnost akumulacije GKT u ćelijama imunskog sistema i njihov antiinflamatoran efekat nameće pitanje da li je protektivno dejstvo GKT isključivo posledica anti-inflamatorne i anti-Th1 aktivnosti ili i direktnog citoprotektivnog efekta u kome intracelularno prisustvo GKT štiti oligodendrocite i neurone od toksičnih medijatora neuroinflamacije. Iz literature je poznato da aktivirana mikroglia i limfociti dovode do oštećenja i apoptoze oligodendrocita. Rezultati ove studije su potvrdili da stimulirani limfociti ispoljavaju citotoksičan efekat na oligodendrocite i neurone. Pored toga je pokazano da GKT svoj protektivni efekat ostvaruju indirektno, inhibicijom produkcije toksičnih medijatora inflamacije od strane aktiviranih limfocita, ali i direktno intracelularnom akumulacijom i posledičnom interferencijom sa indukcijom ćelijske smrti oligodendrocita i neurona, *in vitro*.

U regulaciji urođene i stečene imunosti, kao i u procesima neuroinflamacije i posledičnog oštećenja tkiva CNS, učestvuju MAPK/Akt signalni putevi. Rezultati ove studije su u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju na to da miševi koji su *knockout* za ERK1 imaju povećanu produkciju IFN- $\gamma$  a time i osetljivost na razvoj EAE. U rezultatima ovog istraživanja, GKT tretman je povećao aktivnost ERK i p38 MAPK. Slično tome, različite istraživačke grupe su GKT tretmanom aktivirale p38 MAPK u T ćelijskoj liniji Jurkat i monocitnoj ćelijskoj liniji THP, *in vitro*. Imajući u vidu i podatke o protektivnoj ulozi p38 MAPK, ERK i Akt u neuronima i oligodendrocitima u EAE, možemo zaključiti da bi aktivacija ovih kinaza od strane GKT mogla da doprinese smanjenju demijelinizacije i apoptoze ćelija CNS u ovom istraživanju. Pored apoptoze oligodendrocita, kao patomorfološkog supstrata demijelinizacije, analizirano je i prisustvo autofagije u EAE, kao i sposobnost GKT da je indukuju i modulišu. U limfocitima drenirajućih limfnih čvorova je pokazana smanjena aktivnost AMP zavisne protein kinaze (AMPK) koja je praćena povećanjem nivoa p62, proteina koji se razgrađuje u autofagolizozomima, što govori u prilog blokade autofagije tokom induktivne faze bolesti. Povišen nivo p62, kao i LC3-II, koji se takođe razgrađuje u autofagolizozomima, detektovan je i u tkivu CNS u efektorskoj fazi bolesti. Pošto je autofagija neophodna za uklanjanje oštećenih proteina i mitohondrija, koje se smatraju glavnim generatorom oksidativnog stresa, može se pretpostaviti da je opisana inhibicija autofagije jedan od mogućih mehanizama oštećenja CNS u EAE. Tretman sa GKT je smanjio akumulaciju p62 i LC3-II u tkivu CNS, što ukazuje na njihovu sposobnost da indukuju autofagiju i to mehanizmima

koji su nezavisni od modulacije AMPK-mTOR signalnog puta. Prethodno je u literaturi opisano da GKT aktivacijom autofagije promovišu diferencijaciju tolerogenih dendritskih ćelija i tako smanjuju polarizaciju Th1 i Th17 ćelija, čime se može objasniti supresija Th1 odgovora i smanjenje oštećenja CNS koje je pokazano u ovoj studiji. Međutim, prilikom tumačenja dobijenih rezultata, treba imati u vidu da povišena ekspresija p62 može da bude i posledica transkripcione aktivacije autofagije.

Dugotrajna aplikacija i akumulacija ugljeničnih nanočestica nameće pitanje njihovog izlučivanja iz organizma. Različite studije su pokazale da ugljenične nanočestice, koje su akumulirane u jetri i slezini miševa, ne ispoljavaju toksične efekte. Kupferove ćelije jetre i makrofagi slezine i pluća mogu da fagocituju GKT, i razgrade ih uz pomoć mijeloperoksidaze. Slično opisanim rezultatima, i u ovoj studiji intracelularna akumulacija GKT nije uticala na vijabilitet ćelija, *in vitro*. Slični rezultati su dobijeni i u prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da GKT nisu bile citotoksične za različite ćelijske linije (U251 ćelije, humane neuronske stem ćelije i progenitorske kardiomiocite). Na osnovu svega navedenog, sposobnost akumulacije GKT u tkivima i ćelijama imunskog sistema može biti u korelaciji sa njihovom sposobnošću da modulišu tok EAE.

#### **D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze**

1) Tosić J, Stanojević Z, Vidicević S, Isaković A, Ćirić D, Martinović T, Kravić-Stević T, Bumbasirević V, Paunović V, Jovanović S, Todorović-Marković B, Marković Z, Danko M, Micusik M, Spitalsky Z, Trajković V. Graphene quantum dots inhibit T cell-mediated neuroinflammation in rats. *Neuropharmacology*. 2019;146:95-108.

(IF = 4.249)

#### **E. ZAKLJUČAK (Objasnenje naučnog doprinosa disertacije):**

Doktorska disertacija „Ispitivanje protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u modelu neuroinflamacije kod pacova“, kandidatkinje Jelene Tasić, predstavlja originalan naučni doprinos u razjašnjavanju celularnih i molekularnih mehanizama dejstva GKT u modelu neuroinflamacije. Ova doktorska disertacija predstavlja primer temeljnog i dobro osmišljenog istraživanja zahvaljujući jasno definisanim ciljevima i originalnom metodološkom pristupu koji su uz primenu savremene metodologije doprineli kvalitetu dobijenih rezultata. Sveobuhvatni pristup sagledavanju neuroprotektivnog dejstva uključio je kako analizu kliničkih i histoloških promena, tako i analizu medijatora inflamacije, aktivnosti Akt, MAPK i signalnog puta autofagije pomoću savremenih molekularno-bioloških tehnika.

Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci. U skladu sa time GKT značajno ublažavaju kliničke simptome EAE i redukuju pojavu relapsa, što je posledica smanjenja inflamacije, demijelinizacije i oštećenja neurona u CNS. Celularni mehanizmi terapijskog dejstva GKT u EAE uključuju inhibiciju Th1 odgovora i direktnu zaštitu oligodendrocita i neurona od citotoksičnosti proinflamatornih medijatora, što na molekularnom nivou korelira sa aktivacijom MAPK i Akt signalnih puteva, kao i modulacijom autofagije. Na osnovu svega navedenog, rezultati proistekli iz ovog istraživanja mogu da doprinesu razvoju novih terapijskih strategija u prevenciji neuroinflamacije u neuroinflamatornim/ neurodegenerativnim bolestima.

Imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidatkinje, kao i kvalitet napisane disertacije koja prema svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada, ova komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da usvoji pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji Jelene Tasić i odobri njenu javnu odbranu.

**Mentor:**

\_\_\_\_\_  
prof. dr Aleksandra Isaković

**Komentor:**

\_\_\_\_\_  
prof. dr Vladimir Trajković

**Članovi Komisije:**

\_\_\_\_\_  
prof. dr Dušan Popadić

\_\_\_\_\_  
doc. dr Željka Stanojević

\_\_\_\_\_  
prof. dr Vladislav Volarević

\_\_\_\_\_  
N. sar. dr Verica Paunović

\_\_\_\_\_  
VNS. dr Svetlana Jovanović Vučetić

Beograd, 11. jul 2019. godine