

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20. 5. 2021 godine, odlukom broj **9700/14-KA** imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom i mitogenom aktivirane protein kinaze p38 u indukciji autofagije i smrti u ćelijama neuroblastoma tretiranim oksidopaminom u uslovima *in vitro*“** kandidatkinje **Katarine M. Arsikin Csordás**. Mentor ove teze je **prof. dr Vladimir Trajković**, komentor ove teze je **dr Ljubica Harhaji Trajković**.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

**1. Prof. dr Aleksandra Isaković**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**2. dr Gordana Tovilović Kovačević**, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**3. Prof. dr Silvana Andrić**, redovni profesor, Prirodnomatemički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija Katarine Arsikin Csordás je napisana na 63 strane i podeljena u poglavlja: uvod, ciljevi, materijali i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 23 slike i 2 sheme. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji i biografiju kandidata.

U **uvodu** disertacije predložen je kratak osvrt na rasprostranjenost Parkinsonove bolesti

(PB), poznate faktore rizika, i molekularne mehanizme koji dovode do odumiranja dopaminergičkih neurona u PB. Opisane su i karakteristike i mehanizmi neurotoksičnog delovanja 6-hidroksidopamina (oksidopamin, 6-OHDA), koji čine ovu supstancu pogodnom za korišćenje u eksperimentalnim modelima PB. Oksidativni stres se smatra jednim od glavnih faktora rizika za razvoj PB, a ujedno je i glavni činilac u neurotoksičnosti oksidopamina.

Ukratko je izložen pregled ključnih proteina, i događaja na molekularnom nivou u indukciji autofagije i njenoj regulaciji. Posebna pažnja je posvećena opisivanju različitih poremećaja i promena u indukciji autofagije i autofagnom fluksu u neurodegenerativnim oboljenjima, kao i njihovim mogućim uzrocima. Poznato je da različiti mimetici PB imaju različit uticaj na autofagiju, kao i da oksidativni stres može pokrenuti autofagiju u određenim uslovima.

U kontekstu inicijacije autofagije i njene regulacije, obrađene su kinaze mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), Akt i AMPK (adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza), njihove poznate interakcije, i specifičnosti vezane za njihovo delovanje u neuronima. Razmotrena je njihova uloga u neurodegenerativnim oboljenjima, u smislu uticaja ovih kinaza na autofagiju u neurodegenerativnim oboljenjima, odnosno kako modulacija aktivnosti ovih kinaza može uticati na preživljavanje neurona.

Poznato je da MAP kinaze mogu uticati na regulaciju autofagije, a pogotovo da mogu imati ulogu u preživljavanju neurona, zbog čega je prikazano i poznato delovanje MAP kinaza u neurodegenerativnim oboljenjima, u preživljavanju neurona i u regulaciji autofagije.

U uvodu je prikazana i shema koja ilustruje neke od poznatih efekata i interakcija MAP kinaza, mTOR, AMPK, Akt, i autofagne mašinerije.

Imajući u vidu da do momenta objavljivanja ove studije nije bila poznata uloga autofagije u preživljavanju neurona tretiranih 6-OHDA, niti je bila poznata uloga AMPK/mTOR signalnog puta, niti MAP kinaza u indukciji autofagije i smrti ćelija neuroblastoma tretiranih oksidopaminom, definisani su sledeći **ciljevi** ovog rada: 1. Ispitati sposobnost 6-OHDA da indukuje autofagiju i smrt u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma, 2. Ispitati uticaj 6-OHDA na aktivnost AMPK/mTOR signalnog puta i MAP kinaze p38 u SH-SY5Y ćelijama i 3. Ispitati ulogu AMPK/mTOR signalnog puta i MAP kinaze p38 u indukciji autofagije, oksidativnog stresa i smrti u SH-SY5Y ćelijama tretiranim oksidopaminom.

U poglavlju **Materijal i metode** opisani su supstance, rastvori i reagensi koji su korišćeni, način i uslove za kultivaciju ćelija korišćenih u eksperimentima, i sledeće

eksperimentalne metode: 1. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija (test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza - MTT, kristal violet test - CV, test oslobađanja laktat dehidrogenaze - LDH), 2. Ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija fazno kontrastnom mikroskopijom, 3. Ultrastrukturalna analiza ćelija transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM), 4. Analiza parametara ćelijske smrti (određivanje tipa ćelijske smrti, merenje aktivacije kaspaza) protočnom citofluorimetrijom, 5. Merenje unutarćelijske produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta protočnom citofluorimetrijom, 6. Detekcija autofagije u ćelijama bojenim akridin oranžom (detekcija unutarćelijskog zakišeljavanja pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa, detekcija autofagije pomoću protočnog citofluorimetra), 7. Imunoblot analiza (određivanje koncentracije proteina u uzorcima, elektroforeza i transfer, imunoblot i detekcija proteina), 8. Utišavanje ekspresije gena pomoću RNK interferencije (prolazna transfekcija kratkom interferirajućom RNK, transfekcija kratkom ukosničastom RNK), 9. Statistička analiza.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, rezultati istraživanja su razmatrani na sveobuhvatan način i tumačeni u skladu sa podacima iz literature.

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

U poslednjem poglavlju je prikazan pregled **literature** citirane u doktorskoj disertaciji, koja sadrži 179 navoda.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti ove doktorske disertacije, utvrđen je "Similarity indeks", odnosno procenat podudarnosti teksta u finalnoj verziji disertacije, koji iznosi 21%.

Iako je kandidatkinja pokušala da unekoliko izmeni tekst u poglavlju 3 („Materijali i metode”), u kome program iThenticate detektuje značajnu podudarnost teksta, i tako uspela da smanji prvobitni procenat podudarnosti sa 27% na 21%, program iThenticate je opet prepoznao veliki deo teksta u poglavlju “Materijali i metode”: nazive većine supstanci koje su korišćene u eksperimentalnom radu, njihove proizvođače, čak i navedene koncentracije i razblaženja. Prepoznati su i nazivi samih metoda (i u Sadržaju i u samim podnaslovima), kao i

veći deo uputstava za sprovođenje eksperimentalnih metoda. Verujemo da ne bi bilo moguće dalje značajno smanjiti procenat podudarnosti, bez izostavljanja ključnih podataka o materijalima i smanjivanja tačnosti i preciznosti objašnjenja metoda koje su korišćene u izradi ove disertacije, a koje bi išlo nauštrb reproducibilnosti rezultata.

S druge strane, u poglavljima 1 („Uvod”), 2 („Ciljevi”), 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), nađena je podudarnost prevashodno u citatima, te pojedinačnim rečima i često korišćenim frazama koje se tiču pojava koje se obrađuju u disertaciji. Napominjemo da nijedna misaona celina, niti pojedinačna tvrdnja, izneta u poglavljima 4 („Rezultati”), 5 („Diskusija”) i 6 („Zaključci”), gde se apsolutno zahteva originalnost i autentičnost u doprinosu naučno-istraživačkom radu, nije pokazala podudarnost sa do sad objavljenim radovima, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu (“Glasnik Univerziteta u Beogradu”, broj 204/18).

### **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da oksidopamin dovodi do dozno zavisnog smanjenja udela živih ćelija (MTT i kristal violet testom), odnosno porasta procenta mrtvih ćelija (LDH testom) u kulturi neuroblastoma. Na osnovu ovih rezultata izračunata je približna  $IC_{50}$  ( $50\mu M$ ) koja je korišćena u daljim eksperimentima. Protočnom citofluorimetrijom uz odgovarajuće bojenje ćelija, utvrđeno je da 6-OHDA dovodi do eksternalizacije fosfatidilserina na ćelijskoj membrani, aktivacije kaspaza i povećanog oksidativnog stresa. Tretman oksidopaminom dovodi i do promene morfologije neuroblastomskih ćelija, što je sve saglasno sa indukcijom apoptoze u SH-SY5Y ćelijama.

Da bi se ustanovilo da li 6-OHDA izaziva autofagiju u SH-SY5Y ćelijama, ćelije obojene akridin oranžom analizirane su fluorescentnim mikroskopom i pomoću protočnog citofluorimetra, pomoću kojih je utvrđena akumulacija kiselih vezikula odnosno zakišeljavanje citoplazme. Putem imunoblota, pokazana je konverzija LC3 proteina i degradacija p62 proteina, a prisustvo vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem, obuhvaćenih jednostrukom ili dvostrukom membranom, potvrđeno je transmisijom elektronskom mikroskopijom (TEM). Takođe, imunoblot tehnikom je pokazano da dolazi do aktivacije AMPK i njenog direktnog supstrata Raptor, kao i supresije mTOR kinaze, i njene nishodne mete S6 kinaze (S6K) u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-OHDA.

Pomoću utišavanja genske ekspresije AMPK pokazano je da je oksidopaminom indukovana aktivnost AMPK odgovorna za indukciju mTOR zavisne autofagije u SH-SY5Y ćelijama. Imunoblotom je utvrđeno da 6-OHDA snažno aktivira i Akt kinazu, koja se suprotstavlja indukciji autofagije u SH-SY5Y ćelijama.

Oksidopamin indukuje citotoksičnu autofagiju: inhibicija autofagije, bilo farmakološkim inhibitorima ili utišavanjem ekspresije LC3 proteina suprimira citotoksično delovanje 6-OHDA na SH-SY5Y. Stimulacija autofagije rapamicinom potencira neurotoksično dejstvo oksidopamina. Autofagija zapravo doprinosi indukciji apoptoze u SH-SY5Y ćelijama, i genetička inhibicija autofagije korelirala je sa smanjenjem eksternalizacije fosfatidil serina, smanjenjem aktivacije kaspaza i oksidativnog stresa.

Dakle, AMPK aktivira a Akt inhibira citotoksično delovanje autofagije indukovane oksidopaminom: aktivacija AMPK je ključna za indukciju citotoksične autofagije oksidopaminom u SH-SY5Y ćelijama, a citotoksičnost autofagije stimulirane oksidopaminom posredovana je apoptozom, zavisnom od aktivacije kaspaza i oksidativnog stresa. S druge strane, aktivacija Akt štiti SH-SY5Y ćelije od toksičnog delovanja 6-OHDA.

Oksidopamin aktivira MAP kinaze ERK i JNK, ali se pokazalo da ove kinaze nemaju značajnu ulogu u toksičnom delovanju 6-OHDA na SH-SY5Y ćelije. Međutim, pokazalo se da 6-OHDA snažno aktivira MAP kinazu p38, koja deluje citotoksično, s obzirom da inhibitor ove kinaze značajno opravilja vijabilitet ćelija tretiranih oksidopaminom. Korišćenjem inhibitora p38 i genetičke inhibicije autofagije, pokazano je da aktivacija p38 i autofagija ne utiču jedna na drugu, te da iako su oba fenomena zavisna od aktivacije AMPK, autofagija i aktivacija p38 predstavljaju dva nezavisna događaja.

Primenom antioksidansa N-acetil cisteina utvrđeno je da inhibicija oksidativnog stresa spasava neurone od citotoksičnog delovanja 6-OHDA. Antioksidans inhibira citotoksičnu autofagiju i aktivaciju AMPK, kao i sledstvenu aktivaciju p38, koje su indukovane oksidopaminom.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Rezultati kandidatkinje su detaljno upoređeni sa podacima iz literature. Poređenje rezultata sa rezultatima ranijih studija govori da su postignuti rezultati u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima, sa jasnim isticanjem novih saznanja u vezi sa postavljenim istraživačkim pitanjima.

U ovoj disertaciji pokazano je da neurotoksin 6-OHDA u SH-SY5Y neuroblastomskim ćelijama indukuje citotoksičnu, proapoptosku autofagiju, koja je posredovana oksidativnim stresom, aktivacijom AMPK i inhibicijom mTOR. Nezavisno od indukcije autofagije, aktivacija AMPK oksidopaminom dovodi i do neurotoksične aktivacije MAP kinaze p38. Dakle, oksidativnim stresom posredovana aktivacija AMPK učestvuje u proapoptotskom delovanju oksidopamina na neuroblastomske ćelije pokretanjem dva međusobno nezavisna neurotoksična mehanizma: indukcijom citotoksične autofagije i aktivacijom p38 MAP kinaze.

Eksperimentalno je pokazano da tretman 6-OHDA izaziva snažan oksidativni stres, koji dovodi do apoptoze zavisne od kaspaza u SH-SY5Y neuroblastomskim ćelijama, što je u skladu sa više puta dokumentovanom sposobnošću 6-OHDA da stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) van i unutar ćelija indukuje kaspazno zavisnu apoptozu u neuronima (Ju i sar., 2010). Aktivacija apoptoze potvrđena je karakterističnim morfološkim promenama na ćelijama i snažnom aktivacijom kaspaza.

Ispitano je i potvrđeno prisustvo karakterističnih pokazatelja autofagnog fluksa u kulturi neuroblastoma tretiranoj oksidopaminom: konverzija LC3 proteina, prisustvo autofagozoma i autolizozoma, zakišeljavanje citoplazme i degradacija p62 proteina. Po prvi put je pokazana indukcija i propagacija autofagije u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-OHDA, koja je potvrđena u brojnim kasnijim studijama (Achour i sar., 2016; Li i sar., 2016).

U cilju rasvetljavanja uloge autofagije, kandidatkinja je upotrebila različite pristupe modulaciji autofagije: farmakološke inhibitore i ranih (3-metil adenin, vortmanin) i kasnih (bafilomicin A1, amonijum hlorid, hlorokin) faza autofagije, utišavanje ekspresije gena za LC3 protein pomoću RNK interferencije, i rapamicin, koji inhibira mTOR i aktivira autofagiju. Sinteza dobijenih rezultata nesumnjivo ukazuje da autofagija pokrenuta oksidopaminom u SH-SY5Y ćelijama ima citotoksično dejstvo, što je saglasno sa kasnijom *in vivo* studijom na pacovima (He i sar., 2017).

Pokazano je da autofagija verovatno doprinosi umiranju neuroblastomskih ćelija tako što potencira oksidativni stres i apoptozu, što je saglasno sa studijom Chung i saradnika (2018). Na ovo bi se moglo nadovezati objašnjenje za odsustvo povećane koncentracije beklina-1 prilikom inicijacije autofagije, da beklina-1 nezavisna autofagija može biti uključena u indukciju apoptoze, kao što je navedeno u studiji Grishchuk i saradnika (2011).

U ovoj studiji po prvi put je pokazana sposobnost 6-OHDA da indukuje aktivaciju AMPK u SH-SY5Y ćelijama, što su druge studije kasnije potvrdile (Urano i sar., 2018; Zhou i Cheng, 2019). Rezultati ove studije su prvi put pokazali i da je aktivacija AMPK odgovorna

za indukciju citotoksične autofagije oksidopaminom (Urano i sar., 2018; Zhang i sar., 2017; Xu i sar., 2015). Inhibicijom ekspresije AMPK i farmakološkom aktivacijom mTOR utvrđeno je da autofagija indukovana oksidopaminom zavisi od aktivacije AMPK/Raptor signalnog puta i posledične inhibicije mTOR, a slični rezultati su dobijeni na drugoj neuroblastomskoj ćelijskoj liniji, PC12 (Xu i sar., 2015).

U ovoj studiji utvrđeno je i da oksidopamin aktivira Akt kinazu u SH-SY5Y ćelijama, čije je zaštitno delovanje na ćelije posredovano inhibicijom citotoksične autofagije, saglasno sa studijama na drugim neuronskim ćelijskim linijama i *in vivo* (Xu i sar., 2014; Cheng i sar., 2011).

U skladu sa rezultatima drugih autora, 6-OHDA je aktivirao MAP kinaze ERK (Weng i sar., 2007) i JNK (Crocker i sar., 2011), no inhibicija nijedne od ove dve kinaze nije imala značajan efekat na vijabilitet SH-SY5Y ćelija tretiranih oksidopaminom. Pokazano je i da 6-OHDA snažno aktivira p38 MAP kinazu, što je u skladu sa nalazom pojačanog prisustva fosforilisane forme p38 u neuronima *substantia nigra pars compacta* obolelih od PB (Wang i sar., 2012). Za razliku od ERK i JNK, pojačana aktivnost p38 u ovom istraživanju je doprinosila indukciji apoptoze, i na taj način bila direktno povezana sa toksičnim efektima 6-OHDA (Gomez-Lazaro i sar., 2008).

S obzirom da inhibitor p38 nije uticao na aktivnost AMPK u ćelijama tretiranim oksidopaminom, dok je genetička supresija AMPK u potpunosti inhibirala aktivnost p38, utvrđeno je da aktivacija AMPK nije posredovana aktivacijom p38, ali da 6-OHDA upravo preko aktivacije AMPK aktivira MAP kinazu p38, što je podržano nalazima Filomeni i saradnika (2011). S obzirom da inhibicija p38 nije uticala na autofagiju, niti je inhibicija autofagije uticala na aktivaciju p38, može se zaključiti da su aktivnost p38 i autofagija, koji se javljaju u SH-SY5Y ćelijama tretiranim oksidopaminom, dva nezavisna događaja.

Ključna uloga RKV u neurotoksičnosti 6-OHDA (Blum i sar., 2001) potvrđena je sposobnošću antioksidansa N-acetil cisteina da neutrališe toksično delovanje oksidopamina na SH-SY5Y ćelije. S obzirom da je N-acetil cistein značajno smanjio aktivaciju AMPK i aktivaciju autofagije, može se zaključiti da je upravo oksidativni stres odgovoran za indukciju AMPK zavisne autofagije (Zhao i sar., 2017 ; Yun i sar., 2020). Primećeno je i da genetička supresija AMPK i autofagije smanjuju oksidativni stres indukovani oksidopaminom, što navodi na zaključak da između oksidativnog stresa, aktivacije AMPK i indukcije citotoksične autofagije postoji pozitivna povratna sprega, koja doprinosi propagaciji neurotoksičnog delovanja 6-OHDA. Pored toga, od ranije je poznato da RKV posreduju u aktivaciji p38 izazvanoj oksidopaminom (Kwon i sar., 2014), što je slučaj i u ovoj studiji.

Očigledno je da je regulacija autofagije i njena uloga u neurodegeneraciji rezultat vrlo složene integracije raznih signala, koji sigurno zavise i od eksperimentalnih uslova primenjenih u različitim istraživanjima, i neophodna su opsežna istraživanja da bi se bolje razjasnila njena uloga u PB. Kao što navode Xilouri i Stefanis (2011), verovatno je da autofagija u početku patogeneze PB ima zaštitnu ulogu, omogućavajući uklanjanje štetnih i nefunkcionalnih struktura, dok njena preterana aktivacija u kasnijim fazama doprinosi umiranju neurona, tako da se model neurotoksinom izazvane ćelijske smrti, koji je korišćen u ovoj studiji, može koristiti za razmatranje kasnijih faza PB.

Uz sva ograničenja *in vitro* studije, koja pojednostavljuje realne uslove koji postoje u mozgu obolelih od PB, rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju da bi AMPK, MAP kinaza p38 i autofagija mogle biti dobre mete za terapiju neurodegeneracije.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije:**

**Arsikin K**, Kravic-Stevovic T, Jovanovic M, Ristic B, Tovilovic G, Zogovic N, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L. Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(11):1826-36. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.08.006.

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „ Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom i mitogenom aktivirane protein kinaze p38 u indukciji autofagije i smrti u ćelijama neuroblastoma tretiranim oksidopaminom u uslovima *in vitro* “, kandidatkinje Katarine Arsičin Csordás, predstavlja originalan naučni doprinos u razjašnjavanju uloge protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK), autofagije i MAP kinaze p38 u neurotoksičnom oštećenju neurona izazvanom oksidopaminom. Rezultati ovog istraživanja doprinose razjašnjavanju mehanizama koji se nalaze u osnovi oštećenja i smrti dopaminergičkih neurona, a eksperimentalni model i pretpostavljeni efektorski mehanizmi ispitivani u ovoj disertaciji su pre svega relevantni za razmatranje kasnijih faza patogeneze PB. Imajući u vidu učestalost ovog oboljenja, kao i činjenicu da se prvi simptomi javljaju tek nakon što je veći deo dopaminergičkih neurona izgubljen, rezultati izneti u ovoj disertaciji su tim zanimljiviji jer dodatno ukazuju na moguće strategije u modulaciji neurodegeneracije u Parkinsonovoj



bolesti.

Ova doktorska disertacija urađena je prema svim principima naučnog istraživanja. Naučni pristup je dobro osmišljen, ciljevi su bili jasno formulisani, metodologija rada je bila savremena i raznovrsna. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani, razložno i detaljno diskutovani, i iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidatkinje, Komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kandidata dipl. molekularnog biologa Katarine Aršikin Csordás i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 07.06.2021 godine

Članovi komisije:

Mentor:

---

Prof. dr Aleksandra Isaković

---

Prof. dr Vladimir Trajković

---

Prof. dr Silvana Andrić

Komentor:

---

dr Ljubica Harhaji Trajković

---

dr Gordana Tovilović Kovačević