

NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.09.2023. godine, odlukom broj 14/XVI-1/3-RJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom modelu traumatske povrede mozga“

kandidata dr Rade Jeremić, zaposlene na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentori doktorske teze su prof. dr Predrag Brkić (Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu) i doc. dr Sanja Dacić (Institut za fiziologiju i biohemiju “Ivan Đaja” Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu).

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Marina Đelić**, predsednik, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Dr Irena Lavrnja**, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Otto Barak**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Rade Jeremić napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 108 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 11 tabela, 1 grafikon i 35 slika. Doktorska disertacija sadrži još: podatke o komisiji, pismo zahvalnosti, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica, sadržaj, spisak publikovanih radova, biografiju doktorandkinje, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** su opisani aktuelna definicija, klasifikacija i epidemiološke karakteristike traumatskog oštećenja mozga (engl. *traumatic brain injury*). Detaljno su opisani primarno i sekundarno oštećenje mozga. Dat je uvid u različite eksperimentalne modele traumatskog

oštećenja mozga, sa fokusom na izabran model povrede, sukcionu ablaciju desnog senzomotornog korteksa (ASK). Zatim, detaljno su prikazani reparativni procesi (odgovor astrocita i mikroglije) i proces adultne neurogeze. Dat je prikaz postojećih terapijskih strategija lečenja traumatskog oštećenja mozga. Detaljno su opisani mehanizmi dejstva hiperbarične oksigenacije (HBO) i objašnjeno je potencijalno mesto HBO u protokolu lečenja traumatskog oštećenja mozga.

Ciljevi rada su precizno formulisani, a sastoje se od ispitivanja uticaja ASK i HBO tretmana na ćelije mikroglije u korteksu i određivanja fenotipa aktivirane mikroglije oko mesta povrede; identifikovanja fenotipa astrocita oko mesta lezije i ispitivanja uticaja HBO tretmana na morfološke karakteristike astrocita i stvaranje glijalnog ožiljka; analiziranja neuronalnog odgovora na ASK i HBO tretman na osnovu ekspresije nestina markera neuralnih stem ćelija i antiinflamatornog citokina IL-10, u korteksu oko mesta povrede i u subventrikularnoj zoni lateralnih komora (SVZ), ispitivanja genske ekspresije molekula markera neuronalne plastičnosti (*Dcx*); ispitivanja uticaja ASK na citoskeletnu mrežu unutar aksona i analiziranja efekta HBO tretmana na neurofilamente nakon povrede; ispitivanja uticaja ASK i HBO tretmana na proces adultne neurogeneze oko mesta lezije i u SVZ, kao i na migraciju i maturaciju neuroblasta u SVZ i rostralnom migratornom putu; ispitivanja uticaja ASK i HBO tretmana na nezrele neurone u subgranularnoj zoni (SGZ), na zrele granularne neurone zubate vijuge (DG) i proteinsku ekspresiju molekula markera neuronalne plastičnosti (DCX).

U poglavlju **Materijal i metode** su jasno izneti detalji eksperimentalnog dizajna i korišćenih savremenih metoda i tehnika. Definisano je da su u radu korišćeni 10 nedelja stari, mužjaci pacova soja *Wistar albino* koji su u laboratoriji čuvani pod kontrolisanim standardnim ambijentalnim uslovima. Istraživanje je urađeno u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji i odobreno je od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Beogradu (rešenje broj 61206-2915/2-20, datum izdavanja: 22.09.2020. godine). Naglašeno je da su za potrebe ovog istraživanja korišćene životinje koje su nasumično razvrstane u pet grupa: 1. fiziološka kontrola (FK), 2. *Sham* kontrola (SHAM), 3. *Sham* + HBO grupa (SHBO), 4. grupa lezija (L) i 5. lezija + HBO grupu (LHBO). Opisan je protokol za traumatsko oštećenje mozga na eksperimentalnom modelu (ASK) i HBO protokol. Detaljno je opisan način žrtvovanja životinja i pravljenja preparata. Napravljeni preseki su obojeni imunohistohemijski (DCX) i imunofluorescentno (FJB, DCX, GFAP, nestin, NeuN, SMI32, MAP1b, IL-10, ED1, TNF- α , β -tubulin, TUJ1, Ki67). Delovi mozga oko mesta lezije, kao i odgovarajući delovi u kontrolnim grupama su korišćeni za ispitivanje ekspresije proteina - *Western blot* (DCX) i ekspresije gena - PCR (*Dcx*). Jasno je opisan način kvantifikovanja broja imunoreaktivnih ćelija, merenja intenziteta fluorescentnog bojenja, rekonstrukcije neurona, ukupne dužine nastavaka, broja tačaka granjanja, broja dendritskih terminala i segmenata u cilju procene dendritske arborizacije i kvantifikacije prosečne dužine nastavaka po astrocitu.

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

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Jasno je sumiran i prodiskutovan značaj dobijenih rezultata. Razmotreni su i potencijalni mehanizmi delovanja intermitentnog HBO tretmana.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata doktorske disertacije, a konzistentni su sa postavljenim ciljevima istraživanja.

Pregled korišćene **Literature** sadrži spisak od 262 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju odgovor mikroglije, astrocita i neurona oko mesta lezije na ablaciju senzomotornog korteksa (ASK) i primenjeni tretman hiperbaričnom oksigenacijom (HBO). Takođe, jedan deo rezultata posvećen je ispitivanju procesa adultne neurogeneze u subgranularnoj (SGZ) i subventikularnoj zoni (SVZ) posle ASK i HBO tretmana u eksperimentalnom modelu povrede mozga. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da kontinuirani HBO tretman ispoljava neuroprotektivni efekat i stimuliše adultnu neurogenezu u neurogenim zonama mozga, što ukazuje na postojanje potencijala za primenu HBO u terapijskim protokolima za lečenje TBI.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ASK stimuliše aktivaciju mikroglije. Desetog dana nakon ASK ove ćelije uglavnom eksprimiraju TNF- α i oko mesta povrede dominantan je proinflamatorni M1 fenotip. Nasuprot tome, deset tretmana HBO smanjuje reaktivnu mikrogliozu, ćelije mikroglije su morfološki sličnije mirujućoj mikrogliji i dominantno eksprimiraju antiinflamatorni citokin IL-10 što ukazuje da HBO tretman pomera polarizaciju mikroglije ka antiinflamatornom M2 fenotipu. ASK stimuliše stvaranje glijalnog ožiljka koji ograničava mesto povrede u korteksu. Reaktivni astrociti imaju hipertrofirano telo i dugačke nastavke, IL-10 su negativni i pripadaju proinflamatornom A1 fenotipu astrocita. Sa druge strane, HBO tretman smanjuje stvaranje glijalnog ožiljka nakon ASK i dovodi do stvaranja sredine koja je pogodna za oporavak povređenog tkiva. U LHBO grupi astrociti su GFAP/IL-10-pozitivni, pripadaju antiinflamatornom A2 fenotipu. Imaju hipertrofisano telo, ali kraće nastavke, koji po dužini nalikuju nastavcima astrocita u kontrolnoj grupi što je potvrđeno i morfometrijskom analizom ovih ćelija. Dodatno, primenjeni HBO tretman smanjuje oštećenja citoskeleta i degeneraciju nervnih ćelija izazvane ASK i doprinosi očuvanju morfologije neurona. ASK dovodi do supresije adultne neurogeneze oko mesta lezije i SVZ, dok HBO tretman stimuliše procese neurogeneze oko mesta lezije i u SVZ. HBO povećava proliferaciju NSC, stimuliše migraciju neuroblasta ka mestu lezije i ubrzava maturaciju ovih ćelija u SVZ i migratornom putu od SVZ do mesta povrede. ASK pokazuje specifičan uticaj na DG uzrokujući ćelijsku smrt neurona pretežno u unutrašnjoj trećini granularnog sloja i u SGZ DG hipokampusa. HBO tretman sprečava gubitak novonastalih nezrelih neurona i zrelih neurona u granularnom sloju DG i sprečava degeneraciju dendrita nezrelih neurona u SGZ. HBO tretman povećava broj ćelija koje proliferišu nakon povrede.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

TBI nastaje usled dejstva spoljašnje sile, a podrazumeva izmene moždanih funkcija ili prisustvo vizualnih, laboratorijskih i radioloških pokazatelja, koji govore u prilog prisutne povrede mozga (Menon i sar., 2010). U svetu više od 50 miliona ljudi godišnje doživi neki oblik TBI (Maas i sar., 2017). Specifični model traumatskog oštećenja mozga, ablacija senzomotornog korteksa (ASK), korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji je detaljno okarakterisan u velikom broju studija, koje su fokusirane na funkcionalni oporavak nakon povrede (Goldstein, 2003; Brkić i sar., 2012; Lavrnja i sar., 2014). Kandidatkinja je uspešno izazvala navedeni model traumatskog oštećenja mozga.

Nakon ASK dolazi do aktivacije mikroglije i promene njene morfologije. Ovi rezultati pokazuju povećanje koekspresije ED1 i TNF- α nakon traumatskog oštećenja mozga, a smanjenje koekspresije ED1 i IL-10, što govori u prilog polarizaciji mikroglije nakon TBI. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Kumara i saradnika koja je pokazala da mikroglija koja je izolovana 7 dana nakon kontrolisanog kortikalnog udarca (CCI) ispoljava proinflamatorni (M1) fenotip (Kumar i sar., 2016). Sa druge strane, na presecima mozgovog životinja, koje pripadaju LHBO grupi, uočene su ED1/IL-10-pozitivne ćelije, koje odgovaraju antiinflamatornom (M2) fenotipu mikroglije. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Lima i saradnika koja je pokazala da HBO dovodi do smanjenja neuroinflamacije (Lim i sar., 2017). HBO tretman primenjen nakon povrede mozga povećava ekspresiju IL-10. Oko mesta lezije u LHBO grupi uočeno je povećanje koekspresije ED1/IL-10, a smanjenje koekspresije ED1/TNF- α proteina. Ovi rezultati ukazuju da HBO dovodi do polarizacije mikroglije i da nakon HBO tretmana dominira antiinflamatorni (M2) u odnosu na M1 fenotip. HBO, osim što smanjuje reaktivnu mikrogliozu oko mesta lezije, utiče i na morfologiju mikroglije. Mikroglija nakon HBO tretmana ispoljava sličnu morfologiju kao za vreme mirovanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Lima i saradnika, koja je pokazala da HBO značajno inhibira aktivaciju mikroglije i proizvodnju proinflamatornih citokina nakon povrede mozga (Lim i sar., 2017). Sa druge strane, studija koja se bavila uticajem HBO pretretmana na pacove sa indukovanom intracerebralnom hemoragijom, pokazala je da HBO pretretman predstavlja izvesni vid prevencije od nastanka neuroinflamacije i oštećenja nakon TBI, obzirom da je doprineo smanjenju ekspresije M1 fenotipa (Wang i Bil, 2019).

Takođe, nakon ASK došlo je do aktivacije astrocita i njihove akumulacije oko mesta lezije u vidu GFAP-pozitivnog glijalnog ožiljka. Povećan broj GFAP-pozitivnih ćelija oko mesta lezije u ovoj doktorskoj tezi je u saglasnosti sa literaturnim rezultatima (Zhang i sar., 2012). U ovoj tezi, GFAP-pozitivni astrociti u L grupi, neposredno oko mesta lezije, su u isto vreme i IL-10 negativni, što ukazuje na prisustvo proinflamatornog fenotipa astrocita. Sa druge strane intermitentan HBO tretman, primenjen u toku 10 dana nakon povrede mozga, dovodi do aktivacije manjeg broja astrocita, ali i do pomeranja polarizacije reaktivnih astrocita u smeru antiinflamatornog A2 fenotipa. Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa studijom Liu i saradnika koji su pokazali da HBO tretman značajno poboljšava kognitivne funkcije i inhibira proliferaciju astrocita (Liu i sar., 2013). Što se tiče morfoloških karakteristika astrocita u ovoj doktorskoj disertaciji, GFAP-pozitivni astrociti u L grupi imaju veliko telo i dugačke nastavke u odnosu na astrocite, kontrolnih i LHBO grupe. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Zou i saradnika (Zou i sar., 2019), koji su pokazali da A1 astrociti imaju hipertrofirano telo i dugačke

nastavke. U LHBO grupi astrociti su i IL-10-pozitivni, oni imaju hipertrofirano telo, ali kraće nastavke, koji su po dužini slični nastavcima astrocita u FK grupi. Studija Althammer i saradnika je pokazala da sa promenom ekspresije ćelijskih markera, pri čemu dolazi do povećane ekspresije markera za A1 tip, astrociti pokazuju morfološke promene u vidu povećanje površine, volumena, dužine filamenata i veličine tela (Althammer i sar., 2020). Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka može se zaključiti da u ovom modelu povrede mozga pacova HBO tretman preko IL-10 ispoljava svoje pozitivne efekte. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studija koje su pokazale da IL-10 redukuje zapaljenja nakon povrede mozga i kičmene moždine (Zhang i sar., 2015; Nakajima i sar., 2017).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je oko mesta lezije i u SVZ prisutna nestin-imunoreaktivnost u L grupi. Ovi rezultati su u skladu sa studijom koja je pokazala da su nakon eksperimentalnog modela povrede CCI, nestin-pozitivne ćelije prisutne u uskom pojasu oko mesta povrede (Park i sar., 2021). Na preseccima mozgova životinja iz LHBO grupe primećena je izraženija ekspresija nestina oko mesta lezije i u SVZ. Ovi rezultati su u skladu sa studijom u kojoj je ispitivan uticaj električne stimulacije prethodno povređenog tkiva mozga (Park i sar., 2021). U SVZ primećen je veliki broj nestin-pozitivnih ćelija, koje su usmerene ka mestu lezije. Ovi rezultati su u skladu sa studijom sprovedenom na eksperimentalnom modelu moždanog udara u kojoj je pokazano da je adultna neurogeneza nakon povrede, takođe, povećana u SVZ (Nemproirovich-Danchenko i Khodanovic, 2019). HBO tretman nakon ASK dovodi do dodatne stimulacije proliferacije NSC u SVZ zoni gde je prisutan veliki broj nestin/IL-10 pozitivnih NSC. HBO tretman menja morfologiju prekursorskih ćelija u morfologiju zrelih ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Shandley i saradnika, koja je pokazala kognitivno poboljšanje pacijenata sa lakim i umereno teškim TBI nakon HBO tretmana, a koje je u korelaciji sa stepenom mobilizacije NSC (Shandley i sar., 2017).

Dvojno imunofluorescentno bojenje je pokazalo da povreda mozga dovodi do oštećenja citoskeleta aksona. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Wu i saradnika, koji su pokazali da nakon teške TBI dolazi do povećane ekspresije SMI32 (Wu i sar., 2021). Sa druge strane intermitentni HBO tretman, primenjen prvih deset dana nakon povrede, pokazuje povećanu koekspresiju SMI32 i MAP1b, što odgovara regeneraciji aksona. Ovaj rezultat je u skladu sa studijom koja je pokazala da HBO tretman smanjuje oštećenja aksona (Sri Dewi Untari i sar., 2021).

ASK dovodi do oštećenja granularnih neurona DG, na šta ukazuje smanjena NeuN-imunoreaktivnost, koja je prethodno korišćena u cilju predviđanja degeneracije neurona u hipokampusu glodara nakon različitih povreda mozga (Collombet i sar., 2006). Obeležavanje ćelija specifičnim markerima potvrđuje da su uglavnom nezreli neuroni u SGZ podložni degeneraciji. Ova zapažanja su u skladu sa rezultatima drugih studija, koji su takođe potvrdili da su upravo DCX-pozitivni nervni progenitori u ipsilateralnom DG ti koji su indirektno podložni povredama mozga i posledično ćelijskoj smrti (Gao i sar., 2008; Yu i sar., 2008; Wang i sar., 2016). Pored toga, pokazano je i da povreda dovodi do smanjenog grananja dendrita pošteđenih neurona. Oštećenje dendrita, praćeno smanjenjem broja dendritskih trnova/spina, može predstavljati potencijalni anatomski supstrat za barem delimično objašnjenje razvoja posttraumatskog deficita pamćenja (Gao i sar., 2011; Winston i sar., 2013). Za obeležavanje i detekciju ćelija koje proliferišu, zajedno sa DCX, markerom neuronskih

progenitora, korišćen je endogeno eksprimirani marker Ki67. Naime, pokazano je da ASK radikalno smanjuje broj svih proliferišućih ćelija u SGZ, a naročito onih koje pripadaju neuronalnoj lozi. Najupečatljiviji rezultat ovog istraživanja je pokazana protektivna uloga HBO. Naime, HBO štiti neurone od degeneracije nakon ASK i u unutrašnjoj i u spoljašnjoj ivici granularnog sloja DG. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije u kojoj je pokazano da tretman HBO sprečava degeneraciju neurona u granularnom sloju DG (Baratz-Goldstein i sar., 2017). Takođe, HBO sprečava degeneraciju dendrita i značajno smanjuje gubitak novonastalih nezrelih neurona i uzrokuje povećanu proliferaciju svih ćelija nakon ASK. Za razliku od ASK, primena HBO povećava proliferaciju svih ćelija u DG, pri čemu procenat DCX/Ki67-pozitivnih proliferišućih, nezrelih neurona predstavlja oko 50% svih progenitora koji eksprimiraju DCX. Ti rezultati su u skladu sa studijom (Wei i sar., 2015) u kojoj je zapaženo da HBO promoviše proliferaciju NSC i štiti procese učenja i pamćenja kod neonatalnog hipoksično-ishemijskog oštećenja mozga.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Rad in extenso u časopisu sa JCR liste:

1. **Jeremic R**, Pekovic S, Lavrnja I, Bjelobaba I, Djelic M, Dacic S, Brkic P. Hyperbaric Oxygenation Prevents Loss of Immature Neurons in the Adult Hippocampal Dentate Gyrus Following Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4261. doi: 10.3390/ijms24054261 (M21, IF 5,6)

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

1. **Jeremić R**, Peković S, Dacić S, Brkić P. What do we know about adult mammalian hippocampal neurogenesis so far? *Medicinski podmladak.* 2024;75(2). doi: 10.5937/mp75-42260

E) 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 doktorske disertacije, „**Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom modelu traumatske povrede mozga**”, autora **Rade Jeremić**, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi **11%**. Ovaj stepen podudarnosti posledica je bibliografskih podataka o korišćenju literaturu, citata i upotrebe naziva internet domena, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom modelu traumatske povrede mozga“ dr Rade Jeremić predstavlja eksperimentalnu studiju u kojoj su pokazane promene CNS nakon povrede mozga i nakon intermitentnog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja uz poštovanje svih etičkih načela. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci. Traumatsko oštećenje mozga predstavlja globalni zdravstveni problem, za čijim adekvatnim terapijskim protokolima se još uvek traga. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuje da HBO zaslužuje da ima mesto u terapijskim protokolima za lečenje TBI.

Na osnovu svega navedenog, a imajući u vidu dobijene rezultate eksperimentalnog istraživanja kandidatkinje, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Rade Jeremić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 27.09.2023.godine

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Marina Đelić

Dr Irena Lavrnja, naučni savetnik

Prof. dr Otto Barak

MENTORI:

Prof. dr Predrag Brkić

Doc. dr Sanja Dacić