

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ ЗА СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ

Предмет: Извештај Комисије о прегледу и оцени докторске дисертације мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед.

Одлуком Већа за студије при Универзитету број: 06-4797/V-4955/2-15 од 01.04.2015. године именовани смо у Комисију за преглед и оцену докторске дисертације под насловом: “**Нова нанотехнологија на бази клатрина за пренос великих протеинских молекула у централни нервни систем**” кандидата мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед.

Комисија је прегледала предату дисертацију и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОСНОВНИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1.1. Биографски подаци о кандидату

Гордана Станојевић Виталиано је дипломирала на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1985. године. Исте године је добила стипендију Српске академије наука и уметности као најбољи дипломирани студент медицине. Уписала је магистарске студије на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1986. године, на одсеку Неуропсихологија, где је са одличним успехом положила све испите. Магистарске студије је завршила 1990. године, са темом магистарског рада “Епидемиолошка анализа анксиозних поремећаја – утицај наследних фактора”. Положила је специјалистички испит из психијатрије на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1991. године и у САД 2007. године.

У САД је отишла у септембру 1991. године као стипендиста Фогарти центра Националног института за здравство, и истраживачки рад је наставила на Бостонском универзитету од 1991. до 1993. године. Од 1994. до 2002. године је радила као директор научног института VXM компаније (сада EXQOR Inc.) у Бостону. Завршила је специјализацију из психијатрије на Тафтс универзитету у Бостону 2006. године и исте године је запослена као психијатар и инструктор психијатрије на Харвардском универзитету у Бостону у McLean болници. Радила је паралелно на докторској дисертацији, као водећи истраживач на 3 пројекта и сарађивала је на 9 различитих пројеката Националног института за здравство у САД. Њена истраживања финансира Национални институт за здравство у САД (пројекти: R03DA025804, K08DA037465 и R43MH108481) и NARSAD фондација www.bbrfoundation.org.

Самостално или у сарадњи са другим ауторима објавила је преко 30 радова у међународним часописима и зборницима радова и 3 рада у домаћим часописима. Такође, пријавила је 10 патената у САД и 1 у Европи, излагала је на многобројим међународним научним скуповима и семинарима и објавила је 45 радова о нанотехнологији у изводима на међународним конференцијама.

Рад који се директно односи на проблем који се проучава у докторској тези објављен је у престижном међународном часопису са СЦИ листе који припада категорији M21: **G. D. Vitaliano, F. Vitaliano, J. D. Rios, P. F. Renshaw, M. H. Teicher (2012), New clathrin-based nanoplatfoms for magnetic resonance imaging. *PloS One* 7, e35821 (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035821>).**

Публикована су четири реализована патента у вези са клатринском нанотехнологијом:

1. Vitaliano, F. & **Vitaliano G.** Quantum Information Processing Platforms, US Patent # 7,219,018;
2. Vitaliano, F. & **Vitaliano G.** Quantum Information Processing Elements, US Patent # 7,219,017;
3. Vitaliano, F. & **Vitaliano G.** A Laser Light Source, US Patent # 7,216,038;
4. Vitaliano, F. & **Vitaliano G.** Smart Bionanoparticle Elements, US Patent # 7,393,924.

1.2. Оцена способности кандидата за самостални рад

У току израде ове докторске дисертације кандидат мр Гордана Станојевић Виталиано, др. мед., показала је да може самостално и критички да изврши преглед научне литературе, постави проблем и спроведе методе истраживања, да анализира добијене резултате, као и да донесе одговарајуће закључке. Научила је да пише научне пројекте и радове, и да планира унапред решавање потенцијалних проблема који могу да искрсну. Током израде дисертације, развила је нове наноматеријале на бази клатрина и усавршила бројне методе њихове карактеризације, претежно употребом нуклеарне магнетне резонанце, ласерске методе (DLS), трансмисионе електронске микроскопије, флуоресцентне и конфокалне микроскопије, UV-Vis и флуоресцентне спектро-скопије, и хроматографије (FPLC). Такође, успешно је применила различите неуроанатомске, хистолошке, имунолошке и молекуларно-биолошке методе, и спровела транслационе студије на животињама. Показала је завидну сналажљивост у употреби различитих софтвера за анализу слика (Image-J) и података (SPSS и GraphPad Prism). Сматрамо да на основу свега показаног мр Гордана Станојевић Виталиано, др. мед., поседује све квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Предмет и циљеви дисертације

Предмет истраживања ове докторске дисертације усмерен је на испитивања нове нанотехнолошке методе за ефикасни транспорт терапеутских антитела у ЦНС. Велики напредак у лечењу неуропсихијатријских болести је постигнут развојем лекова који су специфични за одређене врсте рецептора у мозгу. Међутим, само 2% малих молекула (< 400 Да), који су кандидати за лечење нервних болести прелази крвно-моздану баријеру (КМБ). Макромолекуларни лекови, као што су антитела, не могу да пређу очувану КМБ. Различите терапије на бази антитела се тренутно развијају за лечење обољења ЦНС, као на пример: дегенеративних болести (деменција, Паркинсонова и Хантингтонова болест), неуроинфламаторних болести (мултипла склероза), церебро-васкуларних болести, трауме мозга, болести рака, болести зависности, итд. Међутим, антитела имају велику молекуларну тежину (око 150.000 Да) што директно спречава њихов транспорт у ЦНС. Само 0,1% антитела прелази из крвних капилара у моздану ткиво, и то дифузијом преко оштећене КМБ или сатурацијом КМБ. Међутим, чак и кад антитела уђу у ЦНС, њихова дифузија кроз интерстицијални простор је веома спора. Треба им 3 дана да пређу само 1 мм. Ефикаснијим преносом и транспортом антитела у ЦНС умањиле би се дозе и избегла нежељена дејства лекова.

Циљеви истраживања докторске дисертације су следећи:

1. Развој и карактеризација нове нанотехнологије базиране на клатрину и демонстрација преноса флуоресцентних клатринских наночестица у ЦНС после давања назалних капи или перитонелних инјекција пацовима;
2. Развој и карактеризација клатринских наночестица за пренос антитела против допаминског Д3 рецептора у ЦНС и потврђивање афинитета и специфичности наночестица за Д3 рецепторе у кортикалним мембранама мозга;
3. Анализа дистрибуције, стабилности и специфичности наночестица за Д3 рецепторе у мозгу после давања антитела пацовима у назалним капима са клатрином или без клатрина, или после давања плацеба;

4. Утврђивање и поређење концентрација антитела у регионима мозга после давања антитела пацовима у назалним капима са клатрином или без клатрина, или после давања плацеба;
5. Тестирање неуротоксичности наночестица после давања антитела пацовима у назалним капима са клатрином, или после давања плацеба.

2.2. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед., написана је на енглеском језику на 151 страна, и садржи 47 слика и 7 табела. На почетку се налази Резиме на енглеском и српском језику. Структура рада у потпуности кореспондира са идејама и предлозима из образложења предмета и формулисаних циљева истраживања. Докторска дисертација садржи осам поглавља. У поглављу 1. *Увод* (од стране 11 до стране 61) детаљно су описани: Терапијска антитела; Допаминско-3 антитело; Крвно-мождана баријера; Транспорт молекула преко крвно-мождане баријере; Парацелуларни транспорт и отварање крвно-мождане баријере; Трансцелуларни транспорт катјонизованих и спојених протеина; Телијски транспорт; Заобилажење крвно-мождане баријере; Транспорт наночестицама и Клатрински транспорт. Потом следе истраживачка и расправна саопштења (од стране 61 до стране 116) 2. *Циљеви истраживања*; 3. *Методе истраживања*; 4. *Резултати истраживања*; 5. *Дискусија резултата* и 6. *Закључак*. На крају се налазе два поглавља: 7. *Литература* и 8. *Биографија* (од стране 117 до стране 151).

2.3. Кратак приказ појединих поглавља

У првом поглављу је дат приказ макромолекуларних антитела која се користе у медицинске сврхе, као и приказ постојећих ДЗ рецепторских лиганда и антитела, описана је крвно-мождана баријера (КМБ) и медицинске методе за пренос антитела преко КМБ. Такође су описане главне групе наночестица које се користе за транспорт антитела у истраживањима. На крају су представљена физичко-хемијска и биолошка својства клатрина, битна за наномедицинску примену.

У другом поглављу су јасно приказани циљеви истраживања и хипотезе на којима се базира докторска дисертација.

У трећем поглављу је дат приказ метода које су се користиле за *in vitro* и *in vivo* карактеризацију клатринских наночестица. Да би се остварили предложени циљеви истраживања, у докторској дисертацији су коришћене стандардне методе:

1. Анализа физичко-хемијских и биолошких својстава клатрина и клатринских наночестица са ДЗ-антителима битних за наномедицинску примену;
2. Анализа биодистрибуције клатрина у регионима мозга пацова после интраназалне и интраперитонеалне примене;
3. Тестирање афинитета ДЗ-наночестица за допаминске ДЗ рецепторе на кортикалним мембранама мозга пацова;
4. Мерење концентрације ДЗ антитела у ДЗ регионима мозга пацова;
5. Анализа биодистрибуције и стабилности ДЗ-наночестица у ДЗ регионима мозга (olfactory tubercle, islands of Calleja, ventralni pallidum, nucleus accumbens, striatum, frontal/ parietal cortex, hippocampus, medial mammillary bodies, anteroventral thalamic nucleus, substantia nigra/ ventral tegmental area, cerebellum- lobules 9, 10);
6. Тестирање неуротоксичних ефеката ДЗ наночестица у мозгу.

У истраживању су коришћени следећи уређаји, тестови и софтвери:

1. Трансмисиона електронска микроскопија и ласерска метода (ДЛС) за мерење величине клатрина и ДЗ-клатринских наночестица;

2. Флуоресцентна спектроскопска метода и SDS-PAGE (натријум додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза) за утврђивање броја флуоресцентних молекула на клатрину;
3. Брадфордска спектроскопска метода за мерење концентрације клатрина;
4. Спектроскопска метода на бази Арсена за мерење концентрације гадолинијумског контраста на клатринским наночестицама;
5. Нуклеарна магнетна резонанца за мерење релаксивитета наночестица и концентрације гадолинијума;
6. Вестерн блот за одређивање имунореактивности Д3 наночестица;
7. ЕЛИСА за одређивање концентрације антитела;
8. Флуоресцентна и светлосна микроскопија, конфокална микроскопија, имунохистохемијске и имунофлуоресцентне хистолошке методе су се користиле у анализи дистрибуције и неуротоксичности Д3 наночестица;
9. Софтвери (SPSS и GraphPad Prism) су се користили за статистичке анализе.

У четвртом поглављу су представљени експериментални резултати и њихова анализа. Клатрин протеин (величине 17,7 нм) је модификован за пренос 81 молекула гадолинијума или 25 флуоресцентних молекула. Утврђена је величина и структура наночестица и концентрација протеина и гадолинијума у наночестицама. Релаксивитет наночестице је измерен у 0,47 Т магнетном пољу. Јонски релаксивитет је износио $16 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ док је молекуларни релаксивитет износио $1166 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Флуоресцентне наночестице које су дате пацовима интраперитонеалним или назалним путем су успеле да прођу КМБ и да продру у мозак. Да би се утврдила специфичност наночестица за допаминске ћелије мозга, један молекул допаминског-3 антитела је повезан са клатрином. Д3 наночестице (величине 42,3 нм) су дате пацовима у носним капима (64 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Три сата касније Д3 наночестице су нађене у Д3 регионима мозга. Највеће концентрације су измерене у вентралном палидуму и острвима Calleja (2753 ng/g или 17,2% ИД/г), нуклеусу акумбенсу (1028 ng/g) и хипокампусу (1062 ng/g). Ниске концентрације Д3 антитела су нађене у малом мозгу (84 ng/g). Наночестице нису нађене у регионима мозга који не садрже Д3 рецепторе и Д3 антитела без клатрина нису ушла у ЦНС. Резултати су показали да су клатринске наночестице омогућиле да се антитела брзо и ефикасно транспортују у специфичне Д3 регионе мозга.

У петом поглављу су приказани главни резултати са назначеним правцима даљег рада.

У шестом поглављу су кратко приказани закључци истраживања.

У седмом поглављу (Литература) је цитирано 365 радова.

У осмом поглављу су приказани биографски подаци кандидата мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед.

2.4. Осврт на референтну литературу

У оквиру докторске дисертације цитирано је 365 радова. Већина радова је публикована у врхунским и водећим међународним часописима и радови садрже резултате савремених истраживања еминентних истраживача из области дисертације. Кандидаткиња је детаљно прегледала и приказала литературу из свих релевантних области. Преглед литературе је обухватио различите области наномедицине, нанотехнологије, неуронауке, биоинжењерства, биоматеријала, биофизике, биохемије, молекуларна биологије, фармакологије, неуроанатомије, хистологије, имунологије, неуроонкологије, неурологије и психијатрије. Кандидаткиња је показала завидно познавање ових области и актуелног стања истраживања у њима. Валидација и верификација резултата добијених у оквиру дисертације извршена је кроз поређење са резултатима истраживања објављених у међународним часописима.

3. ОСТВАРЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС

У докторској дисертацији су остварени следећи резултати који представљају значајан допринос у неуронауци, наномедицини и биоинжињерству:

1. Идентификација битних својстава клатринске наночестице (структура, величина, релаксивитет, број лиганда и контраста на наночестици) неопходних за њихову ефикасну употребу у дијагностици и терапији обољења мозга;
2. Потврда хипотезе о пенетрацији флуоресцентних клатринских наночестица у možдано ткиво пацова;
3. Потврда хипотезе да стабилне клатринске наночестице са ДЗ-антителима лако пролазе кроз možдано ткиво и да специфично таргетиују ДЗ регионе мозга.
4. Потврда хипотезе да стабилне клатринске-ДЗ наночестице продиру у нервне ћелије и да реагују са интрацелуларним епитопима ДЗ рецептора;
5. Потврда хипотезе да су клатринске наночестице способне да ефикасно и брзо транспортују адекватне концентрације антитела у специфичне регионе мозга пацова без нежељених дејстава и неуротоксичних ефеката;
6. Потврда ефикасности и примењивости нове нанотехнолошке методе на бази клатрина за транспорт макромолекуларних протеина у ЦНС.

Докторска дисертација кандидаткиње мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед., има посебан значај у неуронаукама, наномедицини и биомедицинском инжињерству, јер представља изузетан напредак у заснивању нове методе за пренос макромолекуларних протеинских лекова у ЦНС. У оквиру дисертације детаљно је описана синтеза и карактеризација нових клатринских наночестица. Посебна пажња је посвећена карактеризацији наночестица *in vivo* у животињама и детаљно је описан улазак наночестица у ЦНС и њихова дистрибуција у мозгу. Резултати су показали да су клатринске наночестице омогућиле да се антитела транспортују управо у специфичне допаминске регионе мозга. У поређењу са претходним биотехнолошким студијама, у овом истраживању су коришћене 300 пута мање дозе антитела, јер је нова метода знатно ефикаснија. Клатринске наночестице су омогућиле ефикасан пренос антитела у ћелије мозга, њихову реакцију са трећом петљом Г-протеин-спрегнутог рецептора унутар ћелија и детекцију ДЗ рецептора у цитоплазми и мембрани ћелије. Наночестице су притом имале минимална нежељена дејства на организам животиња.

Резултати су од огромног практичног значаја јер омогућавају напредак у области решавања горућег проблема преноса лекова преко крвно-мождане баријере методом са минималним нежељеним нуспојавама. Ова нанотехнологија ће омогућити развој тераностика за снимање и праћење молекуларних промена у мозгу и за ефикасно лечење болести мозга антителима која су специфична за одређене врсте ЦНС рецептора. Напредак у развоју нанотехнологије за пренос терапеутских протеина у ЦНС је од изузетног значаја за дијагностику и терапију рака, неуродегенеративних и неуро-инфламаторних обољења, церебро-васкуларних болести, трауме мозга, болести зависности, психотичних и афективних поремећаја итд.

4. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Резултати истраживања кандидата мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед., доприносе повећању нивоа знања у биомедицинском инжињерству и наномедицини, као и унапређењу и усавршавању нових нанотехнологија у неуронаукама. Комисија је установила да поднета докторска дисертација има све неопходне садржаје и да је написана према установљеним стандардима. Рад је у свему остварен у складу са одобреном темом и подржаним образложењем. Предмет и циљеви истраживања су јасно наведени. Изложени материјал је одлично систематизован и добро организован. Као резултат испитивања нове нанотехнологије на

Харвардском универзитету и у EXQOR компанији у Бостону проистекао је публиковани рад у престижном научном часопису PLoS ONE и четири реализована патента. На основу предочених анализа рада, Комисија је закључила да су изнети веома значајни и оригинални резултати истраживања нове нанотехнологије на бази клатрина која брзо и ефикасно транспортује антитета у централни нервни систем.

Комисија закључује да дисертација испуњава све законске, формалне и суштинске услове, као и све критеријуме вредновања докторске дисертације на Универзитету у Београду, на Студијама при Универзитету. Имајући у виду квалитет и обим резултата и њихову презентацију Комисија је закључила да докторски рад "Нова нанотехнологија на бази клатрина за пренос великих протеинских молекула у централни нервни систем" кандидата мр Гордане Станојевић Виталиано, др. мед., чини значајан и оригиналан допринос научним областима неуронауке, наномедицине и биоинжињерства. Пошто су и сви остали прописани услови за одбрану докторске дисертације задовољени, са задовољством предлажемо Већу за студије при Универзитету да одобри њену одбрану.

У Београду, 24.12.2015. године

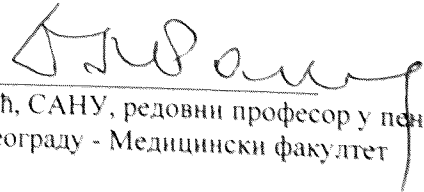
ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ



др Слободан Малобабић, редовни професор у пензији
Универзитет у Београду - Медицински факултет



др Дејан Раковић, редовни професор
Универзитет у Београду - Електротехнички факултет



академик Љубисав Ракић, САНУ, редовни професор у пензији
Универзитет у Београду - Медицински факултет



др Ненад Игњатовић, научни саветник
Институт техничких наука САНУ, професор по позиву
Универзитет у Нишу - Медицински факултет



др Зоран Марковић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт нуклеарних наука, Винча