

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.02.2019. godine, broj 9700/02-IZ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje poremećaja neurogeneze u subgranularnoj zoni hipokampusa na mišjem modelu Alchajmerove bolesti“

kandidata dr Ivana Zaletela, zaposlenog na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Nela Puškaš

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Milica Labudović Borović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Miloš Bajčetić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Emilija Manojlović Gačić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. VNS dr Marija Švirtlih, viši naučni saradnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu
5. Doc. dr Ivan Čapo, docent Medicinskog fakulteta 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 doktorke disertacije:

Doktorska disertacija dr Ivana Zaletela napisana je na ukupno 113 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 32 slike i 15 grafikona. Doktorska disertacija sadrži podatke o komisiji, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica, biografiju kandidata, izjave o autorstvu, istovetnosti i korišćenju.

U poglavlju **UVOD** prikazani su epidemiološki, molekularno-patogenetski i morfološki aspekti Alchajmerove bolesti (AB), kao i animalni modeli koji se koriste za proučavanje ovog neurodegenerativnog oboljenja. Poseban osvrt dat je na transgeni (Tg) mišji 5xFAD model AB, koji je korišćen kao eksperimentalni model u ovoj doktorskoj disertaciji. Detaljno je opisan process adultne neurogeneze u subgranularnoj zoni (SGZ) dentatnog girusa (DG) hipokampusa, a ukratko je i dat pregled najnovijih otkrića vezanih za ovaj process. U daljem toku uvoda opisan je značaj SOXB (*eng. SRY Related High Mobility Group Box B*) grupe transkripcionih faktora, koji kontrolišu fiziološko odvijanje procesa adultne neurogeneze, sa posebnim akcentom na SOX1, SOX2 i SOX21 transkripcione faktore i njihove efekte na populaciju neuralnih matičnih/prekursornih ćelija (*eng. neural stem/precursor cells*, NSPCs). Poseban osvrt je dat na molekularne markere koji se koriste za vizuelizaciju određenih procesa u sklopu adultne neurogeneze u hipokampusu, kao što su procesi proliferacije (Ki-67) i diferencijacije (dablkortin, DCX). Ukazano je i na značaj neurotrofičkog faktora poreklom iz mozga (*eng. brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), koji pored regulacije sinaptičke plastičnosti utiče na process stimulacije i preživljavanja novostvorenih neurona unutar hipokampusa. Izneti su i podaci o povezanosti između poremećaja u procesu adultne neurogeneze i razvoja AB, a ukazano je i na postojanje potencijalnih problema u korišćenju animalnih modela za proučavanje procesa neurogeneze u AB.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno i precizno definisani i iskazani su kroz pet ciljeva: 1) uporedna analiza broja zrelih granularnih neurona u DG hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih netransgenih (NeTg) kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja; 2) Uporedna analiza broja ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa u SGZ hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja; 3) Uporedna analiza broja mladih novoformiranih neurona u SGZ hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja; 4) Uporedna analiza broja ćelija u kojima se detektuje ekspresija SOX1, SOX2 i SOX21 proteina u SZG hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja; 5) Uporedna analiza ukupne količine BDNF proteina u hipokampusu kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** navedeno je koji animalni model AB je korišćen kao model za ispitivanje procesa adultne neurogeneze u SGZ hipokampusa, kao i način na koji su date životinje dobijene u postupku rasploda i ukrštanja. Opisano je kako su formirane eksperimentalne i kontrolne grupe životinja na osnovu njihovog genotipa (Tg, NeTg), pola

(mužjaci, ženke) i starosti (6, 8, 16 nedelja), kao i način na koji su životinje žrtvovane, a njihovi mozgovi izolovani za potrebe daljih analiza. Dat je i grafički prikaz šeme organizacije 12 eksperimentalnih grupa koje su korišćene za potrebe ove doktorske disertacije.

Detaljno je opisan postupak pripreme tkiva za histohemijska i imunohistohemijska bojenja, nakon čega su opisane vrste i procedure urađenih bojenja. U cilju orijentacije na tkivnim presecima, procene očuvanosti morfologije hipokampusa i dobijanja digitalnih mikrofotografija, primenjena je *Kluver-Barrerova* metoda bojenja. Vizuelizacija amiloidnih plakova izvršena je bojenjem tkivnih preseka Tioflavinom-S. Opisana je procedura imunofluorescentne detekcije SOX1, SOX2, PCNA i DCX proteina, koji su korišćeni za vizuelizaciju NSPCs. Detekcija zrelih neurona, proliferišućih ćelija, novostvorenih neurona i NSPCs izvršena je na parafinskim presecima upotrebom sledećih imunohistohemijskih markera: NeuN, Ki-67, PCNA, DCX, SOX1, SOX2, SOX21. Opisan je proces kvantifikacije imunoreaktivnih ćelija, kao i mikroskopi koji su korišćeni za pomenute morfometrijske analize i dobijanje digitalnih mikrofotografija. Takođe je detaljno opisana i Western blot metoda koja je korišćena za imunoblot analizu ukupne količine BDNF proteina u hipokampusu. Briga o životinjama i eksperimentalne procedure primenjene u ovom istraživanju bile u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe i odobrene su od strane Etičke komisije za laboratorijske životinje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i Etičke komisije za laboratorijske životinje Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

U poglavlju **REZULTATI** detaljno su opisani i jasno predstavljeni dobijeni rezultati kroz sledeće sistematične celine:

- Rezultati ispitivanja histološke strukture SZG hipokampusa kod 5xFAD miševa;
- Rezultati detekcije amiloidnih plakova u hipokampusu 5xFAD miševa;
- Rezultati analize ukupnog broja granularnih neurona unutar dentatnog girusa hipokampusa;
- Rezultati analize broja Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa;

- Rezultati imunofluorescentne detekcije ekspresije SOX1 i SOX2 proteina u subgranularnoj zoni hipokampusa;
- Rezultati analize broja SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa;
- Rezultati poređenja broja granularnih neurona, kao i imunoreaktivnih Ki-67, DCX, SOX1, SOX2 i SOX21 ćelija između životinja različite starosti;
- Rezultati immunoblot analize BDNF proteina.

Dobijeni rezultati su prikazani tekstualno, grafički i putem slika.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na jasan, pregledan i sveobuhvatan način izneo potencijalna objašnjenja i značaje svog istraživanja, povezujući i upoređujući ih sa rezultatima drugih međunarodno publikovanih istraživanja. Kandidat je izneo i ograničenja koje je ovo istraživanje nosilo sa sobom, ali je ukazao i na moguće smernice budućih istraživanja koje bi mogle detaljnije rasvetliti proces adultne neurogeneze i njen značaj u AB.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najvažniji zaključci koji su proistekli iz rezultata rada, a koji su u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja.

Korišćena **LITERATURA** sadrži spisak od 188 referenci.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da analiza histološke strukture hipokampusa kod ispitivanih eksperimentalnih životinja, nije ukazala na prisustvo svetlosnomikroskopski vidljivih patoloških promena koje su karakteristične za neurodegenerativna oboljenja. Međutim, bojenje tioflavinom S na fluorescentnoj mikroskopiji je pokazalo intenzivnije deponovanje plakova u DG hipokampusa kao i u dubokim slojevima kore velikog mozga kod Tg miševa starosti 16 nedelja, dok kod Tg miševa starosti 6 i 8 nije detektovano prisustvo plakova.

Analizom ukupnog broja granularnih neurona, vizuelizovanih NeuN markerom, u DG hipokampusa nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike tokom procesa starenja, kako kod mužjaka tako i kod ženki, kao ni između NeTg i Tg miševa oba pola, unutar sve tri starosne grupe.

Kvantitativna analiza ukupnog broja proliferišućih ćelija koje su bile pozitivne na Ki-67 protein pokazala je da ne postoje statistički značajne razlike u broju Ki-67 imunoreaktivnih ćelija između NeTg i Tg miševa oba pola, kako kod životinja starosti 6 nedelja, tako i kod životinja starosti 8 i 16 nedelja. Analiza proliferišućih ćelija tokom procesa starenja pokazala je da se njihov broj statistički značajno razlikuje kod mužjaka istih genotipova i to između mužjaka starosti 6 i 16 nedelja i starosti 8 i 16 nedelja. Slični rezultati dobijeni su i analizom broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija kod ženki miševa gde je statistički značajna razlika dobijena između ženki starosti 6 i 16 nedelja i starosti 8 i 16 nedelja.

Uprkos očuvanoj proliferativnoj aktivnosti, već u 8. nedelji starosti značajno je smanjen broj nezrelih neurona, obeleženih DCX, kod svih životinja oba pola u odnosu na životinje starosti 6 nedelja. Rezultati uporedne analize pokazali su i statistički značajan pad u broju nezrelih neurona kod 5xFAD Tg mužjaka u odnosu na NeTg kontrole, što ukazuje na rani poremećaj neurogeneze kod Tg mužjaka starosti 8 nedelja. Nasuprot mužjacima, kod ženki oba genotipa se trend značajnog pada broja mladih nezrelih neurona može detektovati i u 16. nedelji u odnosu na životinje starosti 8 nedelja. U hipokampusu Tg i NeTg životinja starih 8 nedelja uočava se razlika i u morfologiji DCX pozitivnih ćelija, u korist klase I kod mužjaka, a klase II kod ženki

Broj ćelija u kojima je detektovana ekspresija SOX1 proteina bio je značajno manji u hipokampusu svih životinja starosti 8 i 16 nedelja u odnosu na grupe životinja starosti 6 nedelja i time prati promene u broju DCX pozitivnih ćelija. Uporedna analiza pokazala je statistički značajno manji broj SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod NeTg mužjaka u odnosu na NeTg ženke starosti 6 nedelja, kao i smanjenje broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod mužjaka oba genotipa starosti 8 nedelja u odnosu na ženke. Kod Tg životinja oba pola starosti 8 nedelja detektovan je značajno manji broj SOX1 pozitivnih ćelija u odnosu na njihove NeTg kontrole.

Broj ćelija u kojima je detektovana ekspresija SOX2 proteina bio je značajno manji u hipokampusu svih životinja starosti 8 i 16 nedelja u odnosu na grupe životinja starosti 6 nedelja i time SOX2, kao i SOX1, prati promene u broju DCX pozitivnih ćelija. Uporedna analiza je pokazala statistički značajno manji broj SOX2 imunoreaktivnih ćelija samo kod Tg ženki starosti 8 nedelja u odnosu na njihove NeTg kontrole.

Broj ćelija u kojima je detektovana ekspresija SOX21 proteina je bio značajno manji u hipokampusu kontrolnih životinja oba pola starosti 16 nedelja u odnosu na grupe životinja starosti 6 i 8 nedelja. Kod Tg životinja oba pola, značajan pad u broju SOX21 pozitivnih ćelija se detektovan je znatno ranije, već u 8. nedelji, u odnosu na grupe životinja starosti 6 nedelja. Takođe, Tg životinje oba pola u 8. nedelji starosti, kao i Tg mužjaci u 16. nedelji starosti eksprimirali su značajno manji broj SOX21 imunoreaktivnih ćelija u odnosu na svoje NeTg kontrole.

Rezultat Western blot analize ukazuje da kod miševa starosti 8 i 16 nedelja ne postoje razlike u ukupnoj količini BDNF proteina između NeTg i Tg jedinki. Takođe, rezultati sugerišu da je ukupna količina BDNF proteina u hipokampusu kod Tg miševa starih 6 nedelja niža u odnosu na kontrolne životinje.

C. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Tema doktorske disertacije bila je ispitivanje procesa adultne neurogeneze na 5xFAD animalnom modelu AB kod jedinki starosti 6, 8 i 16. nedelja i njen značaj leži u činjenici da je po prvi put pokazano da se nivo ekspresije SOX1, SOX2 i SOX21 transkripcionih faktora u ćelijama SGZ hipokampusa 5xFAD miševa animalnog modela AB i njihovih kontrola, menja u zavisnosti od pola, uzrasta i genotipa ispitivanih životinja.

Rezultati ove disertacije potvrdili su prethodno publikovane podatke o poremećaju neurogeneze u SGZ (Oakley i saradnici, 2006; Moon i saradnici, 2014) i utvrdili da su amiloidni depoziti u velikom broju prisutni u hipokampusu, kao i dubokim slojevima kore velikog mozga životinja starih 16 nedelja.

Smanjenje broja DCX imunoreaktivnih neurona zabeleženo je kod Tg 5xFAD mužjaka, a u odnosu na NeTg kontrolne miševe starosti 8 nedelja, dok kod životinja starih 6 i 16 nedelja nije pokazana statistički značajna razlika u broju novoformiranih neurona između NeTg i Tg jedinki. U svom radu Ziegler-Waldkirch i saradnici (2018) pokazali su da kod 5xFAD životinja starosti 6. nedelja ne postoji smanjenje nivoa neurogeneze, ali da u 4. mesecu dolazi do povećanja broja Ki-67 i DCX imunoreaktivnih neurona kod Tg u odnosu na NeTg životinje. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima Moon i saradnika (2014) koji su pokazali smanjenje broja DCX imunoreaktivnih neurona u uzrastu od 4. meseca kod 5xFAD miševa, kao i sa našim rezultatima analize DCX i Ki-67 imunoreaktivnosti, gde statistički značajna razlika u ovom uzrasnom periodu nije detektovana. U disertaciji se navodi da

potencijalno objašnjenje za ove suprotnosti u rezultatima trebati tražiti u metodološkom pristupu, tj. razlici u genotipu miševa na kojima je 5xFAD linija napravljena, kao i imunohistohemijskoj metodologiji i načinima kvantifikacije imunoreaktivnih ćelija, koja se razlikovala između navedenih studija. Takođe, ne treba zanemariti ni postojanje varijacija između samih jedinki, tj. potencijalni uticaj epigenetskih faktora na razvoj adultne neurogeneze, a koji još nisu dovoljno proučeni. Istovremeno, ekspresija DCX proteina razlikovala se kod ženki miševa u odnosu na mužjake. Naime, kod ženki je pokazano postojanje znatno dužih dendrita koji bi po svojim karakteristikama odgovarali klasi II DCX nezrelih postmitotskih neurona (Plümpe i saradnici, 2006; Van Bokhoven i saradnici, 2011). Detektovane promene bile su najizraženije kod životinja starosti 8 nedelja, kod kojih su istovremeno i zabeležene najintenzivnije promene u procesu adultne neurogeneze. Dobijena morfološka razlika može objasniti izostanak smanjenja neurogeneze kod Tg ženki ovog uzrasta, tj. ukazati na polno-zavisnu razliku u osetljivosti klase I i klase II DCX imunoreaktivnih neurona na preživljavanje i sazrevanje.

Analizom Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija kod životinja istog pola i genotipa, a različite starosti ustanovljeno je vremenski zavisno smanjenje broja ovih ćelija, kako kod NeTg, tako i kod Tg jedinki. U radu Moon i saradnika (2014), koji su koristili životinje uzrasta od 2. do 7. meseci, broj DCX imunoreaktivnih neurona sa starenjem se smanjuje kako kod NeTg, tako i kod Tg miševa. Ihunwo i Schliebs (2010) pokazali su da se kod Tg2576 mišjeg model, Ki-67 i DCX imunoreaktivne ćelije ne mogu detektovati u SGZ hipokampusa kod životinja starosti 18. nedelja, dok su Kuipers i saradnici (2015) pokazali da je broj DCX imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa kod miševa starih 12 meseci niži za skoro 90% u odnosu na isti soj miševa starosti 3 meseca. Ovi rezultati govore u prilog skorašnjim istraživanjima na humanom materijalu i potvrđuju da se intenzitet adultne neurogeneze u hipokampusu smanjuje sa starenjem i da je nakon detinjstva njen nivo nedetektabilan i praktično zanemarljiv (Dennis i saradnici, 2016; Sorrells i saradnici, 2018).

Iako su SOX transkripcioni faktori otkriveni pre više od 20 godina, primarni fokus istraživača bio je usmeren na njihovu ulogu u embrionalnom razvoju i nastanku tumora (Castillo i Sanchez-Cespedes, 2012). Zbog toga njihova uloga u nastanku AB, kao i drugih neurodegenerativnih oboljenja, i dalje nije poznata. Jedan od glavnih razloga zbog koga uloga ovih faktora nije dovoljno proučena u patologiji oboljenja nervnog sistema jeste nepostojanje dovoljno podataka o njihovoj ulozi u fiziološkim uslovima u adultnom mozgu (Chew i Gallo, 2009). Međutim, dostupni literaturni podaci ukazuju da je precizno regulisan nivo ekspresije

određenih transkripcionih faktora, kao što je to npr. slučaj sa SOX2 proteinom, neophodan za pravilno odvijanje procesa diferencijacije NSPCs. Rezultati imunofluorescentne analize koekspresije pokazali su da se nivo ekspresije SOX2 proteina razlikuje između ćelija, kao i da je visok nivo ovog proteina detektovan u mitotski aktivnim (PCNA imunoreaktivnim) ćelijama. Ova zapažanja su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima koji su pokazali da ćelije u različitim fazama diferencijacije eksprimiraju različit nivo SOX2 proteina (Pevny i Placzek, 2005; Steiner i saradnici, 2006). Uporedna analiza imunoreaktivnih ćelija u SGZ 5xFAD miševa i njihovih kontrola pokazala je statistički značajno smanjenje broja ćelija koje eksprimiraju SOX2 samo kod Tg ženki starosti 8 nedelja, ali ne i kod Tg mužjaka. Pad u broju SOX2 imunoreaktivnih ćelija, koji je u našoj studiji zabeležen samo kod 5xFAD Tg ženki starosti 8 nedelja, može predstavljati prolazni pad u nivou ekspresije ovog proteina, koji se sa starenjem normalizuje. Sa druge strane, on može predstavljati i još jedan od dokaza koji govori u prilog da se prve i intezivnije promene kod ovog modela upravo viđaju kod jedinki ženskog pola.

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju i da je ekspresija SOX1 proteina u SGZ hipokampusa smanjena kod 5xFAD modela AB u poređenju sa kontrolama, kao i da je ekspresija SOX1 proteina prisutna u različitim ćelijskim populacijama duž čitave SGZ, uključujući tu i proliferativne (PCNA imunoreaktivne) tip 1 i tip 2 progenitorne ćelije, neuroblaste (DCX imunoreaktivne) i nezrele (DCX imunoreaktivne) neurone. Za razliku od SOX2 transkripcionog faktora, čija je uloga u procesu neurogeneze detaljno opisana, uloga SOX1 transkripcionog faktora u održavanju karakteristika progenitornih ćelija i/ili u procesu njihove diferencijacije je i dalje nedovoljno ispitana (Karnavas i saradnici, 2013). Incijalne studije pokazale su da ekspresija SOX1 stimuliše *in vitro* neuronalnu diferencijaciju P19 ćelija (Pevny i saradnici, 1998) i da u toku razvoja mišjeg korteksa reguliše održavanje nediferentovanog stanja progenitornih ćelija (Elkouris i saradnici, 2011). Rezultati ovog istraživanja po prvi put pokazuju da postoji razlika u broju SOX1 imunoreaktivnih ćelija kako između Tg i NeTg jedinki istog pola, tako i između životinja različitog pola, a istog genotipa. Kao i u slučaju SOX2 proteina, statistički značajna razlika u ekspresiji SOX1 transkripcionog faktora između Tg i NeTg životinja pokazana je samo kod miševa starosti 8 nedelja.

Ovo istraživanje je po prvi put takođe pokazalo promenu ekspresije SOX21 proteina u SGZ hipokampusa kod mišjeg modela AB. Od svih ispitivanih SOXB proteina, ćelije koje eksprimiraju SOX21 protein pokazale su najveće smanjenje brojnosti. Studije na miševima su pokazale da je SOX21 transkripcioni factor neophodan za normalno odvijanje procesa

neuralne diferencijacije u adultnom hipokampusu jer stimuliše prelazak progenitornih ćelija tipa 2a u stadijum 2b (Matsuda i saradnici, 2012). Međutim, neke druge studije navode da SOX21, slično SOXB1 grupi proteina, reguliše održavanje progenitorskih karakteristika i da je smanjenje njegove ekspresije neophodno kako bi se proces diferencijacije započeo (Mallanna i saradnici, 2010; Chakravarthy i saradnici, 2011; Kuzmichev i saradnici, 2012). Smatra se da SOX21 ove različite uloge obavlja na dozno-zavisan način. Po ovom modelu ektopično povećanje nivoa ekspresije SOX21 transkripcionog faktora stimuliše održavanje progenitornih karakteristika ćelija i inhibiciju diferencijacije, tj. formiranje neurona (Whittington i saradnici, 2015).

Ispitivanje nivoa BDNF proteina u homogenatu hipokampusa eksperimentalnih životinja sugerise da se razlika u nivou ovog proteina u hipokampusu može uočiti samo kod 5xFAD miševa starih 6 nedelja u odnosu na njihove NeTg kontrole. Takođe, izostanak razlika u nivou BDNF između životinja različitog genotipa i pola, kod životinja starih 8 i 16 nedelja, sugerise da se ukupan nivo ovog proteina unutar celog homogenata hipokampusa ne menja. Rezultati prethodnih studija na 5xFAD miševima pokazali su da nivoi BDNF proteina u hipokampusu mogu biti niži ili nepromenjeni u odnosu na kontrolne NeTg životinje i da zavise od starosti i pola životinja koje su korišćene u studiji. Tako su Kimura i saradnici (2010) pokazali statistički značajno smanjenje u nivou BDNF-a u hipokampusu kod 5xFAD miševa starosti 6 meseci, a ovaj rezultat potvrđen je od strane Devi i Ohno (2012) koji su zabeležili smanjenje od 49% kod 5xFAD jedinki starosti 12–15 meseci. Različiti rezultati dobijeni su u drugim studijama u kojima je pokazano da ne postoji statistička razlika između NeTg i 5xFAD Tg ženki miševa starosti 7,5 meseci (Fragkouli i saradnici, 2014), dok je novija studija pokazala da su nivoi BDNF proteina u homogenatu hipokampusa dobijenom od 5xFAD miševa starosti 3 meseca statistički značajno niži nego kod njihovih NeTg kontrola (Kaminari i saradnici, 2017).

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

1. **Zaletel I, Schwirtlich M, Perović M, Jovanović M, Stevanović M, Kanazir S, Puškaš N.** Early Impairments of Hippocampal Neurogenesis in 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease Are Associated with Altered Expression of SOXB Transcription Factors. *J Alzheimers Dis.* 2018;65(3):963–76. DOI: 10.3233/JAD-180277. (M22, IF 3,476)

2. Puškaš N, **Zaletel I**, Švrtlih M, Perović M, Stevanović M, Kanazir S. Early impairments of hippocampal neurogenesis in 5xfad-mice are associated with altered expression of SOXB proteins. 16th Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society, Debrecen, Hungary, January 17-18, 2019, Abstract book, p26.
3. Puškaš N, **Zaletel I**, Švrtlih M, Perović M, Stevanović M, Kanazir S. Transgenic mice model of Alzheimer's disease: early changes in the neurogenesis in the subgranular zone of the hippocampus. 10th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, Moscow, Russia, September 13-16, 2018, Morphology, 2018, 153(3):90.
4. **Zaletel I**, Perović M, Jovanović M, Svrtlih M, Stevanovic M, Kanazir S, Puškaš N. Early changes in the neurogenesis in 5xFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease is associated with a decreased expression of SoxB transcriptional factors in the subgranular zone of the hippocampus. 7th congress of Serbian Neuroscience Society with international participation, Belgrade, Serbia, October 25th-27th 2017, Abstract book, p83.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u ispitivanju ekspresije SOXB transkripcionih faktora u procesu adultne neurogeneze u mišjem modelu AB. Doktorska disertacija „Ispitivanje poremećaja neurogeneze u subgranularnoj zoni hipokampusa na mišjem modelu Alchajmerove bolesti“ dr Ivana Zaletela, je prema našim saznanjima, prvi rad koji opisuje poremećaje u ekspresiji SOX1 i SOX21 transkripcionog faktora u SGZ hipokampusa kod mišjeg modela AB. Ovo istraživanje predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju kompleksnih interakcija između SOXB transkripcionih faktora i predstavlja korak ka boljem razumevanju

mehanizama kontrole adultne neurogeneze, kao i njene uloge u nastanku AB. Dobijeni rezultati otvaraju polje za veliki broj daljih istraživanja, koja bi pratila promenu ekspresije ovih transkripcionih faktora tokom dužeg vremenskog perioda, ali koji bi u obzir uzeli i ispitivanje dodatnih molekularnih mehanizama koji utiču na kontrolu SOXB transkripcionih faktora, a samim tim i na ceo proces adultne neurogeneze. Ispitivanje funkcije SOXB transkripcionih faktora može imati i potencijalni istraživački i klinički značaj, jer ovi markeri mogu biti korišćeni za otkrivanje ranih promena u procesu adultne neurogeneze, ali mogu predstavljati i mesta dejstva lekova koji bi stimulisali proces adultne neurogeneze kod pacijenata sa AB.

F. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija „Ispitivanje poremećaja neurogeneze u subgranularnoj zoni hipokampusa na mišjem modelu Alchajmerove bolesti“ dr Ivana Zaletela urađena je prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Ivana Zaletela i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 18.3.2019.

Članovi Komisije:

Prof. dr Milica Labudović Borović

Doc. dr Miloš Bajčetić

Doc. dr Emilija Manojlović Gačić

VNS dr Marija Švirtlih

Doc. dr Ivan Čapo

Mentor:

Prof. dr Nela Puškaš