

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2020. godine, odlukom broj 9700/07-MJT imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uloga kinaze aktivirane adenzin monofosfatom i protein kinaze B (PKB) u neurotoksičnom oštećenju izazvanom 1-metil-4-fenil piridiniumom u uslovima *in vitro*“  
(“Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase and protein kinase B (PKB) in neurotoxic damage induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium *in vitro*”),**

kandidata **Maje Jovanović Tucović**. Mentor ove teze je **prof. dr Ivanka Marković**, komentor ove teze je **prof. dr Vladimir Kostić**.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

- 1. Prof. dr Vladimir Trajković**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
- 2. Prof. dr Aleksandra Isaković**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
- 3. Prof. dr Silvana Andrić**, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodnomatemički fakultet
- 4. Prof. dr Sonja Misirlić Denčić**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
- 5. Ljubica Vučićević**, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu

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 Maje Jovanović Tucović je napisana na 129 strana i podeljena u poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 27 slika i 2 tabele. U poslednjem poglavlju je prikazan pregled literature

citirane u doktorskoj disertaciji, koja sadrži 392 navoda. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

**Uvod** disertacije je izložen na 32 strane, sadrži 6 slika, 2 tabele i podeljen je u pet celina. U prvom delu uvoda kandidatkinja daje osnovne podatke o etiologiji i molekularnim mehanizmima koji su uključeni u neurodegenerativne procese u Parkinsonovoj bolesti (PB), kao i o glavnim epidemiološkim odlikama i prepoznatim faktorima rizika za nastanak bolesti. Takođe, u ovom delu uvoda je prikazana i slika koja pruža sveobuhvatan uvid u molekularne mehanizme koji su uključeni u neurodegenerativne procese u PB, poput: oštećenja sistema za razgradnju proteina, poremećaja homeostaze jona  $Ca^{2+}$ , povećane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) u dopaminergičkim (DA) neuronima i mitohondrijalne disfunkcije. Svi navedeni procesi predstavljaju ključne događaje u indukciji degeneracije DA neurona u PB. U sklopu ovog dela uvoda, kandidatkinja je opisala i neke od monogenih mutacija koje se dovode u vezu sa nastankom naslednog oblika PB. Specifičnosti vezane za različite mutacije su prikazane u tabeli 1.

Drugi deo uvoda posvećen je modalitetima ćelijske smrti dopaminergičkih neurona. Imajući u vidu da Parkinsonovu bolest karakteriše ćelijska smrt u *pars compacta substantiae nigrae* (pcSN) mezencefalona, u ovoj celini su posebno razmatrane morfološke i funkcionalne specifičnosti ćelijske smrti dopaminergičkih neurona. Apoptoza, kao tip ćelijske smrti se vrlo često dovodi u vezu sa različitim hroničnim neurodegenerativnim bolestima, u koje spada i PB. Pored apoptoze, u različitim eksperimentalnim modelima PB, opisano je prisustvo i drugih, neapoptotskih tipova ćelijske smrti, poput nekroze, nekroptoze, ferroptoze i piroptoze, kao i citotoksične autofagije.

U narednom delu uvoda, istaknut je značaj procesa autofagije, kao koordinisanog, kataboličkog procesa, koji se pokreće u uslovima energetske stresa u etiopatogenezi PB. Kandidatkinja u ovom segmentu iznosi morfološke i funkcionalne karakteristike autofagije, mehanizam njene inicijacije (shematski prikazane na slici 4) i regulacije, kao i ulogu autofagije u patogenezi PB.

Četvrti deo uvoda posvećen je saznanjima o ulozi i regulaciji aktivnosti protein kinaza u neuronima u uslovima metaboličkog stresa, sa posebnim osvrtom na serin-treonin (Ser/Thr) kinaze. Među njima se posebno izdvajaju tri evolutivno konzervirane Ser/Thr kinaze: protein

kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (AMPK) koja predstavlja centralni energetski senzor i održava energetsku homeostazu u ćeliji, mTOR kompleks 1 (engl. *Mechanistic target of rapamycin complex 1*, mTORC1), kinaza koja je jedan od glavnih inhibitora autofagije i protein kinaza B/Akt, koja učestvuje u regulaciji brojnih vitalnih procesa poput metabolizma, ćelijskog rasta i preživljavanja, sinteze proteina i u inhibiciji apoptoze. Radi lakšeg razumevanja, kandidatkinja daje i shematski prikaz regulacije aktivnosti ovih protein kinaza na slici 5.

U nastavku uvoda su opisani eksperimentalni modeli koji se koriste u istraživanju etiologije, patologije i molekularnih mehanizama uključenih u degeneraciju neurona u PB. U delu koji se odnosi na hemijski indukovane (neurotoksične) modele, detaljno su opisana dosadašnja saznanja dobijena u modelima primene meperidinskog analoga MPTP/MPP+, koji je do danas ostao jedan od najčešće korišćenih modela za izučavanje molekularnih mehanizama oštećenja DA neurona (metabolizam MPTP/MPP+ je shematski prikazan na slici 6).

**Ciljevi** rada su jasno definisani: ispitivanje citotoksičnog delovanja neurotoksina MPP+ na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y, kao i na aktivnost signalnih puteva AMPK i PKB/Akt. Takođe, jedan od ciljeva rada je i ispitivanje uloge modulacije aktivnosti signalnih puteva AMPK i PKB/Akt i njihove interakcije u indukciji oksidativnog stresa i ćelijske smrti u neuronima tretiranim MPP+.

U poglavlju **Materijal i metode** kandidatkinja je jasno i pregledno izložila na 15 strana u 10 odeljaka materijal i metode koje je koristila u izradi ove doktorske disertacije. U prvom odeljku navedene su sve supstance, reagensi i rastvori, korišćeni u istraživanju. Zatim je, u drugom odeljku, opisana ćelijska linija korišćena u izradi doktorske teze (ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y) i principi kultivacije. U trećem odeljku ovog segmenta teze, kandidatkinja opisuje princip i metodu određivanja vijabiliteta ćelija MTT testom. U sledećem odeljku je izložen metod ispitivanja morfoloških karakteristika ćelija primenom fazno kontrastne mikroskopije. Peti odeljak teze pruža detaljan uvid u metodu protočne citofluorimetrije i izlaže ukratko principe i postupak metoda primenjenih u cilju analize parametara ćelijske smrti i identifikacije promena karakterističnih za apoptozu (fragmentacija jedarne DNK), određivanja produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, merenja potencijala membrane mitohondrija i za detekciju autofagije u ćelijama praćenjem zastupljenosti vezikula kiselog sadržaja u citoplazmi ćelija. Primenom tehnike imunoblota, kandidatkinja je opisala na koji način je analizirala aktivnost, odnosno ekspresiju unutarćelijskih kinaza Akt, AMPK, Raptor, mTOR, p70S6K,

PRAS40, ULK1, kao i proteina 4E-BP1, LC3-II, p62, LAMP-1 i  $\beta$ -aktina. U ovom odeljku je opisana i kvantifikacija aktivnosti proteina denzitometrijskom analizom, primenom kompjuterskog programa ImageJ. Sedmi odeljak se odnosi na opis primenjene metode koimunoprecipitacije, koju je kandidatkinja koristila kako bi ispitala da li postoji interakcija između Akt i AMPK proteina. U osmom odeljku kandidatkinja je opisala metodu nukleoporacije, koja je korišćena u cilju transfekcije SH-SY5Y ćelija malim ukosničastim RNK (shAMPK), odnosno plazmidima koji su nosili gensku informaciju za dnAMPK, dnAkt i wtAkt. Na taj način je modulirana aktivnost AMPK i Akt kinaze. Deveti odeljak opisuje kako su kultivisane i transformisane DH5 $\alpha$  ćelije, radi umnožavanja i izolacije plazmida neophodnih za transfekciju SH-SY5Y ćelija.

Deseti odeljak ovog segmenta teze je dao prikaz statističkih metoda korišćenih u analizi podataka. Za poređenje rezultata dobijenih za nezavisne uzorke korišćen je parametarski – Studentov t-test, dok je za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura korišćena jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), praćena Tukey's post-hoc testom za višestruka poređenja. Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati na 27 strana, u 6 odeljaka i sadrže 20 slika, kao i propratna objašnjenja koja se odnose na podatke prikazane na slikama. Svaki rezultat je analiziran na odgovarajući način i na osnovu njega je izveden jasan zaključak.

U prvom odeljku ovog poglavlja doktorske disertacije prikazan je uticaj MPP+ na: preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u kulturi, njihovu morfologiju, na fragmentaciju DNK, produkciju superoksidnog anjona i uticaj na pad potencijala unutrašnje mitohondrijalne membrane. U drugom odeljku, kandidatkinja je izložila rezultate ispitivanja uloge oksidativnog stresa u ćelijskoj smrti indukovanoj MPP+ toksinom i aktivaciji protein kinaza AMPK i PKB/Akt. Pored toga, kandidatkinja je pokazala da primena antioksidanasa inhibira citotoksično dejstvo MPP+ na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y, ali i da dovodi do smanjenja aktivacije AMPK i Akt signalnih puteva u uslovima delovanja MPP+. Treća celina se odnosi na ispitivanje uloge protein kinaze AMPK u MPP+ modelu PB. U ovom segmentu doktorske disertacije kandidatkinja je pokazala da aktivaciji AMPK izazvanoj delovanjem MPP+ toksina prethodi aktivacija Akt kinaze. Pored toga, pokazano je da usled genske ili farmakološke

inhibicije AMPK kinaze dolazi do povećane produkcije superoksidnog anjona i pada vijabiliteta, dok povoljan efekat primene farmakoloških aktivatora (AICAR i metformin) ukazuje da bi uloga AMPK signalnog puta mogla imati protektivnu ulogu u oštećenju SH-SY5Y ćelija izazvanom MPP+ toksinom. U četvrtom odeljku rezultata prikazani su rezultati ispitivanja uloge PKB/Akt kinaze u citotoksičnom dejstvu MPP+. Kandidatkinja je u svojim rezultatima pokazala da i farmakološka i genska inhibicija Akt kinaze doprinose oksidativnom stresu i oštećenju SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma izazvanom MPP+ toksinom. Takođe, u ovom odeljku kandidatkinja je metodom ko-imunoprecipitacije pokazala da ne dolazi do direktne interakcije između AMPK i Akt kinaze. Peti odeljak ovog poglavlja se odnosi na ispitivanje zastupljenosti i uloge autofagije u MPP+ modelu PB. Prikazani rezultati ukazuju da MPP+ izaziva mTORC1-zavisnu citoprotektivnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma. U poslednjem, šestom odeljku, prikazani su rezultati ispitivanja mehanizma autofagije indukovane MPP+ toksinom. U ovom odeljku kandidatkinja je u svojim rezultatima pokazala da je aktivirana autofagija citoprotektivna, da je posredovana porastom oksidativnog stresa i aktivacijom AMPK signalnog puta, kao i da se javlja u kasnijim vremenskim intervalima praćena inhibicijom mTORC1 kinaze. Pored toga rezultati ove studije ukazuju i da je autofagija delimično inhibirana aktivacijom Akt signalnog puta i smanjenjem broja lizozoma.

U poglavlju **Diskusija**, koje je izloženo na 15 strana, rezultati istraživanja su razmatrani na sveobuhvatan način i tumačeni u skladu sa podacima iz literature. Prva celina se odnosi na tumačenje rezultata ispitivanja neurotoksičnog delovanja MPP+ na SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma, i uticaja oksidativnog stresa izazvanog ovim agensom na aktivaciju AMPK, i sledstvenu aktivaciju Akt kinaze. U drugom segmentu su diskutovani rezultati genske i farmakološke modulacije aktivnosti signalnih puteva AMPK i Akt kao i njihova medjusobna povezanost. Pokazano je da AMPK ima protektivnu ulogu u ovom modelu, i da aktivacija AMPK prethodni citoprotektivnoj aktivaciji Akt signalnog puta, pri čemu nije pokazano postojanje direktne interakcije između AMPK i Akt kinaze. U trećem segmentu su diskutovani rezultati koji se odnose na uticaj oksidativnog stresa izazvanog dejstvom MPP+ na aktivaciju autofagije koja je AMPK/mTORC1-zavisna i ima citoprotektivnu ulogu, i može biti delimično inhibirana aktivacijom Akt signalnog puta.

U poglavlju **Zaključci** kandidatkinja je iz svojih rezultata izvela jasne i nedvosmislene

zaključke, koji su u potpunosti odgovorili na postavljene ciljeve istraživanja. Rezultati ove disertacije ukazuju da signalni put AMPK ima protektivnu ulogu u modelu oštećenja ćelija izazvanom MPP+ toksinom, i da bi modulacija aktivnosti AMPK/Akt kinaze i autofagije mogle biti potencijalne mete za postizanje neuroprotektivnih efekata u Parkinsonovoj bolesti.

U poglavlju **Literatura** navedene su 392 reference po abecednom redosledu, koje su u disertaciji citirane vankuverskim stilom.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da primena neurotoksičnog agensa MPP+ dovodi do dozna i vremenski zavisnog citotoksičnog efekta na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y. Analiza ćelijskog ciklusa protočnom citofluorimetrijom pokazala je da 24 h tretman MPP+ indukuje dozna-zavisnu fragmentaciju DNK, koja je jedan od pokazatelja programirane ćelijske smrti - apoptoze. Primenom protočne citofluorimetrije je takođe pokazano da je fragmentaciji DNK prethodilo rano povećanje produkcije superoksidnog anjona i sledstveni pad potencijala unutrašnje mitohondrijalne membrane. Kako su ove promene karakteristične za oksidativni stres, u sledećem segmentu teze kandidatkinja je ispitivala uticaj oksidativnog stresa na oštećenje ćelija izazvanim MPP+, kao i ulogu aktivacije protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) i protein kinaze B (PKB/Akt) u ovom procesu. Utvrđeno je da oksidativni stres dovodi do aktivacije protein kinaze AMPK, koja prethodi aktivaciji PKB/Akt, kao i da primena antioksidanasa smanjuje citotoksično dejstvo MPP+, uz pad u aktivaciji AMPK i Akt kinaza. Ispitujući međusobnu zavisnost aktivacija protein kinaze AMPK i Akt, kandidatkinja je u svojim rezultatima pokazala da u uslovima delovanja MPP+ na ćelije, dolazi do AMPK-zavisne aktivacije Akt kinaze, kao i da se u uslovima genske ili farmakološke inhibicije AMPK indukuje dodatno povećanje produkcije superoksidnog anjona u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y tretiranim MPP+. Sa druge strane, utvrđeno je da AMPK ima neuroprotektivnu ulogu u MPP+ modelu PB, jer je primena farmakoloških aktivatora AMPK dovela do statistički značajnog smanjenja citotoksičnog efekta MPP+ na SH-SY5Y ćelije, uz istovremenu aktivaciju Akt kinaze. Ispitujući ulogu protein kinaze B (PKB/Akt) u MPP+ modelu PB, utvrđeno je da i farmakološka i genska inhibicija Akt signalnog puta povećavaju osetljivost ćelija neuroblastoma na štetno dejstvo MPP+, ali da inhibicija Akt kinaze ne dovodi do promena u aktivnosti AMPK. Pošto je pokazano da AMPK utiče na aktivaciju PKB/Akt, primenom metode ko-

imunoprecipitacije pokazano je da AMPK ostvaruje svoj efekat na Akt kinazu indirektno. U poslednjem segmentu istraživanja, rezultati prikazani u ovoj disertaciji su pokazali da oksidativni stres izazvan delovanjem MPP+, preko aktivacije AMPK, izaziva mTORC1-zavisnu citoprotektivnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma.

Rezultati ove studije ukazuju da aktivacija AMPK u *in vitro* modelu oštećenja DA neurona indukovano MPP+, ima citoprotektivno dejstvo, i da se ono ostvaruje na najmanje dva načina - preko pokretanja AMPK/Akt-zavisne inhibicije oksidativnog stresa i kasnom indukcijom AMPK/mTOR-zavisne citoprotektivne autofagije.

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

Rezultati ove studije su potvrdili da MPP+ dovodi do dozno- i vremenski zavisnog pada vijabiliteta ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, uz fragmentaciju DNK, koja predstavlja jedan od poslednjih molekularnih događaja tokom apoptoze. Naime, u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima PB, pokazano je da MPP+, pored toga što dovodi do citomorfoloških promena koje odgovaraju apoptozi, indukuje i fragmentacije DNK, što je u skladu sa podacima iz literature.

Kandidatkinja Maja Jovanović Tucović je u svojoj doktorskoj disertaciji pokazala da MPP+ dovodi do ranog porasta produkcije superoksidnog anjona, što je prethodilo padu potencijala unutrašnje membrane mitohondrija. Ovakav rezultat je bio saglasan sa podacima iz literature. Još je osamdesetih godina prošlog veka, nakon slučajnog otkrića MPP+ toksina, postavljena je hipoteza da oksidativni stres i poremećena funkcija mitohondrija mogu biti deo patogeneze koja prethodi degeneraciji DA neurona. Istraživači su ispitujući mehanizam citotoksičnog dejstva MPP+ utvrdili da MPP+ indukuje oksidativni stres u DA neuronima inhibicijom mitohondrijalnog kompleksa I LPE. Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji kandidatkinja je pokazala da oksidativni stres indukovano MPP+ toksinom prethodi padu potencijala unutrašnje membrane mitohondrija. Ovakav rezultat je bio u skladu sa rezultatima drugih studija koje su pokazale da je depolarizacija unutrašnje mitohondrijalne membrane indukovana MPP+ toksinom zapravo rezultat udruženog dejstva ROS i direktne inhibicije NADH dehidrogenaze, kao i da dolazi do permeabilizacije spoljne membrane mitohondrija, i do oslobađanja proapoptotskih proteina poput Cyt C, faktora indukcije apoptoze (AIF) i SMAC/DIABLO kompleksa u citoplazmu.

Brojne studije su pokazale da oksidativni stres, pored toga što dovodi do oštećenja

mitohondrija, utiče i na aktivnost velikog broja signalnih puteva uključenih u proces antioksidativne zaštite, održavanje energetske homeostaze i na otklanjanje oštećenih proteina i organela. Rezultati ove studije su pokazali da oksidativni stres izazvan delovanje MPP+ toksina dovodi do aktivacije AMPK i Akt kinaze, da je aktivacija AMPK posredovana oksidativnim stresom, kao i da prethodi aktivaciji Akt kinaze. U literaturi se mogu pronaći podaci da se u uslovima hipoksije i oksidativnog stresa aktiviraju upravo ove dve kinaze. Naime, poznato je da se AMPK aktivira u procesima u kojima raste odnos AMP/ATP, dok je u brojnim studijama pokazano da aktivacija Akt kinaze, u uslovima oksidativnog stresa, dovodi do porasta aktivnosti redoks-senzitivnih transkripcionih faktora, odnosno da aktivacija Akt signalnog puta može imati pozitivan efekat na transkripciju gena enzima antioksidativne zaštite i da na taj način doprinosi smanjenju oksidativnog stresa.

Iako rezultati različitih studija do danas nisu pokazali konzistentne rezultate o ulozi AMPK u oštećenju neurona u Parkinsonovoj bolesti, u ovoj disertaciji je pokazano da aktivacija AMPK ima neuroprotektivni efekat. U ovoj studiji kandidatkinja je pokazala da primena MPP+ toksina dovodi do aktivacije AMPK kinaze. Naime, primenom farmakoloških aktivatora AMPK pokazano je da aktivacija AMPK ima pozitivan efekat na preživljavanje ćelija tretiranih MPP+ toksinom, dok je farmakološka i genska inhibicija AMPK ukazala da je citoprotektivna aktivacija Akt kinaze posredovana aktivacijom AMPK signalnog puta. Međutim, u literaturi se mogu pronaći podaci da aktivacija AMPK može imati i citotoksični efekat na DA neurone. Jedno od mogućih objašnjenja ovih studija u kojima je pokazano da AMPK ima negativan efekat na preživljavanje DA neurona, jeste da prekomerna aktivacija AMPK dovodi do produžene inhibicije mTORC1 i da se na taj način remeti sinteza proteina, integritet i plastičnost sinapsi, što može indukovati smrt DA neurona. Pored toga, primena farmakološke i genske inhibicije Akt kinaze, u ovoj studiji su ukazale na još jedan bitan podatak, a to je da MPP+/AMPK-zavisna aktivacija Akt kinaze ima važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u drugim studijama. Naime, poznato je da Akt kinaza može uticati na aktivaciju različitih transkripcionih faktora, poput Nrf2 koji dalje pokreće transkripciju gena enzima antioksidativne zaštite poput NQO1, GCL i HO-1. Ono što je posebno značajno je da je u ovoj studiji po prvi put pokazano da je aktivacija AMPK indukovana MPP+ toksinom, delimično odgovorna i za aktivaciju Akt signalnog puta. Rezultati ove studije ukazuju da AMPK-posredovana aktivacija Akt signalnog puta inhibira MPP+-toksinom indukovani oksidativni



stres. Naime, u ovom istraživanju je pokazano da farmakološka i genska inhibicija Akt kinaze nisu imale uticaj na aktivaciju AMPK signalnog puta, kao i da je MPP+/AMPK-zavisna aktivacija Akt kinaze doprinela smanjenju oksidativnog stresa. Iako u literaturi postoje podaci da Akt može imati inhibitorno dejstvo na AMPK, to nije bio slučaj sa rezultatom dobijenim u ovoj disertaciji. Rezultati ove doktorske disertacije su bili u skladu sa podacima objavljenim u drugim studijama u kojima je pokazana AMPK-zavisna aktivacija Akt na leukemijskim i neuronskim ćelijama u odgovoru na AICAR (farmakološki aktivator AMPK), tokom diferencijacije mezenhimskih stem ćelija u osteoblaste, u odgovoru endotelskih ćelija na faktore rasta, kao i u aktivaciji makrofaga indukovanoj bakterijskim lipopolisaharidom. Pored toga, u ovoj studiji je pokazano da se ova međuzavisnost AMPK i Akt ne ostvaruje direktnom interakcijom ova dva enzima, odnosno da do AMPK-zavisne aktivacije Akt kinaze dolazi indirektno, za sada još nepoznatim mehanizmom. Iako ne postoji jasan konsenzus o ulozi AMPK u PB, rezultati ove studije ukazuju da aktivacija AMPK u MPP+ modelu ima neuroprotektivni karakter, odnosno da štiti ćelije od neurotoksičnog dejstva MPP+. Ovakva uloga AMPK u MPP+ modelu bi se mogla barem delimično objasniti AMPK-zavisnom aktivacijom Akt signalnog puta i supresijom oksidativnog stresa.

U ovoj studiji je takođe pokazano da u ovom modelu dolazi do kasne indukcije autofagije uz inhibiciju mTORC1 kinaze i njenih nishodnih supstrata pS6k i 4E-BP1 proteina. Primenom različitih farmakoloških inhibitora autofagije, kandidatkinja je u svojim rezultatima pokazala da je aktivirana kasna mTORC-1-zavisna citoprotektivna autofagija. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima drugih istraživačkih grupa u kojima je korišćen inhibitor mTORC1 – rapamicin. Rezultati studija sa rapamicinom, pokazali su da inhibicija mTORC1 ima neuroprotektivno dejstvo i u *in vivo* i u *in vitro* toksičnim modelima PB. Takođe, pokazano je da je diskinezija kao posledica primene L-DOPA, izazvana upravo L-DOPA-zavisnom aktivacijom mTOR signalnog puta u strijatumu miša, i da se može sprečiti primenom rapamicina ili nekog od njegovih analoga. Nasuprot tome, u literaturi se mogu pronaći i podaci da MPTP, 6-OHDA i rotenon suprimiraju aktivnost mTOR kompleksa i smanjuju vijabilitet ćelija. Nekonzistentnost podataka u literaturi u vezi sa ulogom mTORC1 u različitim modelima PB bi se mogla objasniti kao i u slučaju AMPK, dužinom trajanja tretmana i stepenom inhibicije mTORC1. Imajući u vidu da mTORC1 učestvuje u regulaciji brojnih vitalnih, energetski zavisnih procesa poput rasta, diferencijacije, sinteze lipida i proteina, inhibicija ovih procesa u uslovima energetskog stresa bi

u izvesnoj meri mogla imati citoprotektivni karakter. Sa druge strane, produžena inhibicija mTORC1-zavisnih procesa bi mogla da poremeti sintezu proteina, integritet i plastičnost sinapsi, usled čega može doći do smrti DA neurona.

U ovoj studiji je po prvi put pokazano da oksidativni stres indukovani MPP<sup>+</sup> toksinom dovodi do aktivacije AMPK, koja dalje, sa jedne strane, indukuje aktivaciju Akt kinaze, koja ima važnu ulogu u preživljavanju i inhibiciji oksidativnog stresa, dok, sa druge strane, pokreće citoprotektivnu autofagiju koja je zavisna od mTORC1. Naime, u pojedinim studijama je pokazano da različiti neurotoksini imaju različite efekte na autofagiju, da 6-OHDA i rotenon indukuju citotoksičnu autofagiju, dok MPP<sup>+</sup> i parakvat indukuju citoprotektivnu autofagiju. U ovoj disertaciji je primena različitih farmakoloških inhibitora autofagije uzorokovala povećanje citotoksičnog dejstva MPP<sup>+</sup>. Pored toga, u ovoj studiji je pokazano i da aktivacija Akt kinaze može, u izvesnoj meri, kao aktivator mTORC1, da ima nepovoljan uticaj na aktivaciju AMPK i njen citoprotektivni efekat, i to inhibicijom autofagije.

Rezultati ove studije ukazuju da AMPK ima citoprotektivno dejstvo u *in vitro* MPP<sup>+</sup> modelu PB. Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije su po prvi put pokazali da AMPK svoje citoprotektivno dejstvo ostvaruje na najmanje dva načina - pokretanjem AMPK/Akt-zavisne inhibicije oksidativnog stresa i kasnom indukcijom AMPK/mTOR-zavisne citoprotektivne autofagije. Imajući u vidu da bi aktivacija AMPK signalnog puta mogla uticati na ključne mehanizme uključene u proces oštećenja i umiranja DA neurona u PB, modulacija ovog signalnog puta bi se mogla uzeti u razmatranje kao potencijalna meta za neuroprotektivne terapijske strategije u PB.

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

1. **Jovanovic-Tucovic M**, Harhaji-Trajkovic L, Dulovic M, Tovilovic-Kovacevic G, Zogovic N, Jeremic M, et al. AMP-activated protein kinase inhibits MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress and apoptotic death of SH-SY5Y cells through sequential stimulation of Akt and autophagy. *Eur J Pharmacol.* 2019; (M22, IF 3.170)
2. **Jovanovic-Tucovic, Maja**, Marković Ivanka. The role of AMP-activated protein kinase in neurodegeneration in Parkinson's disease. *Med Podml.* 70(4):13–20.

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

Doktorska disertacija „Uloga kinaze aktivirane adenzin monofosfatom i protein kinaze B (PKB) u neurotoksičnom oštećenju izazvanom 1-metil-4-fenil piridiniumom u uslovima *in vitro*“ („Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase and protein kinase B (PKB) in neurotoxic damage induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium *in vitro*”), kandidatkinje Maje Jovanović Tucović, predstavlja originalan naučni doprinos u razjašnjavanju uloge protein kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (AMPK) i protein kinaze B (PKB) u neurotoksičnom oštećenju neurona izazvanom 1-metil-4-fenil piridiniumom. Rezultati ovog istraživanja doprinose razjašnjavanju mehanizama koji se nalaze u osnovi oštećenja i smrti dopaminergičkih neurona i dodatno ukazuju na moguće strategije u modulaciji neurodegeneracije u Parkinsonovoj bolesti. Po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji uz korišćenje raznovrsnih i savremenih molekularno-bioloških tehnika, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada, pa ova komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da usvoji pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji Maje Jovanović Tucović, i da odobri njenu javnu odbranu.

Beograd, 25.05.2020. godine

Članovi komisije:

---

Prof. dr Vladimir Trajković

---

Prof. dr Aleksandra Isaković

---

Prof. dr Silvana Andrić

---

Prof. dr Sonja Misirlić Denčić

---

Ljubica Vučićević, naučni saradnik

Mentor:

---

Prof. dr Ivanka Marković

Komentor:

---

Akademik Prof. dr Vladimir Kostić