

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12.11.2021. године, на основу молбе ментора, др Иване Грковић, вишег научног сарадника Института за нуклеарне науке "Винча" – Институт од националног значаја и др Надежде Недељковић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Милорада М. Драгића, асистента Биолошког факултета под насловом: „Улога пуринског сигналног система у процесима неуродегенерације и неуроинфламације изазваних триметил-калајем у хипокампусу женки пацова“, у саставу: др Тихомир В. Илић, редовни професор, Медицински факултет Војномедицинске академије, Универзитет одбране, др Данијела Лакета, ванредни професор Биолошког факултета, Универзитет у Београду, и др Наташа Митровић, научни сарадник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију .

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата Милорада М. Драгића и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Милорада Драгића припремљена је у виду скупа од три објављена научна рада, који представљају тематску целину, са синтетичким приказом докторске дисертације који садржи увод, дискусију и закључак. Дисертација је написана на 92 стране и садржи следећа поглавља: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима (Увод – 15 страна; Циљ рада – 1 страна; Радови произашли из докторске дисертације – 45 страна; Дискусија – 11 страна; Закључци – 2 стране; Литература – 18 страна) и Прилози (Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу). Списак референци садржи 270 референци.

Анализа докторске дисертације

У Уводу докторске дисертације кандидат најпре даје јасан и садржајан преглед литературе о неуродегенерацији, као и о неуроинфламацији, као пратећој компоненти неуродегенеративних патологија. С обзиром на кључну улогу микроглије и астроцита у неуроинфламацији, посебна пажња посвећена је овим ћелијама у контексту неуроинфламације. Како је у овој докторској дисертацији неуродегенерација изазивана применом триметил-калаја (ТМК), органског једињења које се иначе често користи у

производњи пластике и као инсектицид, посебна пажња је посвећена неуротоксичним ефектима овог једињења. ТМК изазива селективну смрт неурона лимбичког система, посебно на нивоу хипокампуса, а резултујуће хистопатолошке и бихевиоралне промене указују да овај модел може да представља добар анимални модел Алцхајмерове болести. Даље, кандидат објашњава до сада познате механизме неуротоксичног деловања ТМК, пре свега нарушавање интегритета мембране митохондрија, ослобађање унутрашњих депоа Ca^{2+} и оксидативни стрес. Неуродегенерација изазвана ТМК праћена је активацијом микроглије и астроцита, која је нарочито изражена у областима мозга које су најтеже погођене неуродегенерацијом, пре свега у хипокампусу. Важну улогу у неуроинфламацијској активацији глијских ћелија игра аденозин трифосфат (АТР), који се масивно ослобађа из оштећених ћелија, играјући улогу сигнала опасности (DAMP). Како се ова теза бави улогом пуринске сигнализације у неуродегенерацији и неуроинфламацији изазваној ТМК, посебна пажња посвећена је пуринским рецепторима (P1, P2X, P2Y), као и ензимима ектонуклеотидазама који регулишу нивое пуринских нуклеотида и нуклеозидна у ванћелијској течности мозга (NTPDase1-3, NPP1-3, екто-5'-нуклеотидаза/eN/CD73, ткивно-неспецифична алкална фосфатаза). Додатно, описане су познате улоге појединих пуринских рецептора у неуроинфламацији, међу којима су посебно значајни аденозински A_1 , A_{2A} и A_3 рецептори, ADP-сензитивни P2Y₁₂ и P2Y₁₃, UDP/UTP-сензитивни P2Y_{4R} и P2Y_{6R} и ниско-афинитетни АТР-сензитивни P2X₇ на микроглији, као и и ADP-сензитивни P2Y₁ рецептор на астроцитима. Поред тога, описана је и заједничка улога eN/CD73 и аденозинског A_{2A} рецептора астроцита у појачаној аденозинској сигнализацији повезаној са неуродегенерацијом.

Циљеви докторске дисертације су приказани јасно и концизно. Поред главног циља – испитивања улоге пуринске трансмисије у успостављању морфолошког и функционалног профила активације глијских ћелија у моделу интоксикације изазване ТМК, приказани су и појединачни циљеви: на нивоу хипокампуса женки пацова утврдити 1) временски и регионални профил неуродегенерације, 2) временски профил неуроинфламације и пратеће морфолошке промене глијских ћелија; а у погледу компоненти пуринског сигналног система, везано за ектонуклеотидазе утврдити 3) временски профил хидролазних активности *in situ*, испитати 4) промене генске експресије и 5) ћелијску локализацију NTPDase1/CD39 и eN/CD73, а везано за пуринске рецепторе испитати 6) промене генске експресије P2X_{4R}, P2X_{7R}, P2Y_{2R}, P2Y_{6R}, P2Y_{12R}, A_1R , A_{2AR} , A_{2BR} , A_3R укључених у процесе неуродегенерације и неуроинфламације, као и 7) ћелијску локализацију P2Y_{12R}, P2Y_{1R}, P2X₇, A_1R и A_{2AR} , значајних за процесе код активираних глијских ћелија; коначно, 8) испитати повезаност уочених промена на нивоу пуринског сигналног система са функционалним фенотиповима активираних глијских ћелија.

У оквиру поглавља **Радови произашли из докторске дисертације** приложена су 3 рада. У радовима је показано да су прве промене на нивоу понашања уочљиве почев од 2. дана по интоксикацији (п.и.) ТМК, у виду појачане осетљивости на додир и звуке, као и благог тремора, да се врхунац достиже у 4. дану, док се након тога симптоми смањују и у 7. дану животиње показују једино појачану осетљивост на додир и звук. Промене понашања праћене су променама на нивоу хистологије које показују

неуродегенерацију видљиву по појави апоптотских тела и смањења броја неурона у CA1 и mCA3/DG региону хипокампуса 4 дана п.и. који су још израженији у 7. дану п.и., док су први знаци били видљиви већ 2. дана п.и., па је ово окарактерисано као рана фаза неуродегенерације, а након три недеље оштећење је било још израженије, па је ово означено као касна фаза неуродегенерације. Кандидат је показао да долази и до ране активације астроцита у хипокампусу, почев од 2. дана п.и., а детаљном морфометријском анализом убедљиво је демонстрирао да се на нивоу CA1 региона активација до 7. дана п.и. одвија у правцу хипертрофије, док на нивоу mCA3/DG долази до атрофије ових ћелија, као и нарушавања њихове доменске организације, што указује на дихотому природу астроглиозе у раним фазама неуродегенерације. Даље је показано да је неуродегенерација у хипокампусу праћена и израженом активацијом микроглије која касни у односу на активацију астроцита, али се одликује врло динамичним променама у погледу морфологије која из почетних штаполиких и жбунастих форми током ране фазе неуродегенерације прелази у доминантно амебоидну форму 3 недеље п.и. Применом ензимске хистохемије, праћене текстуралном анализом, као и имунохистохемије кандидат је показао да у хипокампусу долази до пораста експресије и ензимске активности NTPDase1 на свим ћелијама микроглије, независно од њихове морфологије, док је пораст експресије и активности eN везан искључиво за амебоидну микроглију и то у регионима изразите неуродегенерације, док је на нивоу генске експресије показан значајан пораст NTPDase1 и у раној и касној фази, за разлику од eN код које до пораста дошло само у касној фази неуродегенерације. У погледу пуринских рецептора значајних за активацију и специфичне функције активираних глијских ћелија, показан је временско-зависни пораст њихове генске експресије, који код P2X₇, P2Y₁, P2Y₁₂ и свих P1 рецептора има бифазну форму, за разлику од P2X₄, P2Y₂ и P2Y₆. Испитивањем инфламацијског статуса ткива хипокампуса, показано је да долази до бифазног пораста генске експресије праћених про- и анти-инфламацијских фактора, у прве три недеље п.и. осим код TNF- α и Arg-1 који се враћају на контролни ниво након 3 недеље, а од посебног је значаја налаз да је пораст проинфламацијских фактора повезан искључиво са астроцитима. У даљој анализи кандидат је демонстрирао појачану експресију P2Y₁, као и A₁ и A_{2A} рецептора на астроцитима, додатно указујући на њих као носиоце инфламације у овом моделу. С друге стране, код микроглије је у раној фази неуродегенерације показано присуство P2Y₁₂ рецептора укљученог у миграцију, док је у касној фази амебоидна микроглија екпримирала P2X₇, повезан са фагоцитозом код ових ћелија, што додатно указује на њихову репаративну функцију.

У оквиру **Дискусије** кандидат је на јасан и садржајан начин сумирао резултате своје докторске дисертације приказане у оквиру три приложена рада и анализирао их у контексту 270 цитираних референци коришћених у овој докторској дисертацији. У тој анализи, кандидат је показао изузетну зрелост и способност да своје резултате тумачи у контексту постојећих сазнања, као и да разуме и представи њихов потенцијални значај у оквиру неуродегенеративних патологија праћених неуроинфламацијом.

У поглављу **Закључци** кандидат је сумирао резултате своје докторске дисертације кроз 6 појединачних закључака, у којима је навео уочене ефекте једнократне апликације ТМК која изазива:

- 1) Промене понашања у виду појачане осетљивости на додир и звук, као и појаве агресивности и системског тремора које отпочињу 2. дана по интоксикацији, показују највећи интензитет 4. дана, након чега наступа опоравак;
- 2) Прогресивну смрт неурона у СА1 и mCA3/DG регионима хипокампуса, почев од 2. дана по интоксикацији;
- 3) Рану дихотому морфолошку трансформацију астроцита у виду хипертрофије у СА1 и атрофије у mCA3/DG региону хипокампуса;
- 4) Проинфламацијску активацију астроцита праћену порастом генске експресије P2Y₁R, A_{2A}R и A₁R;
- 5) Временски-специфичну одложену активацију микроглије у зонама неуродегенерације почев од 4. дана по интоксикацији праћену специфичним морфолошким променама;
- 6) Доминантно неуропротективну трансформацију микроглије праћену порастом експресије NTPDase 1 код свих микроглијских ћелија у хипокампусу, а eN само код амебоидне микроглије на месту неуродегенерације, као и порастом експресије пуринских рецептора значајних за хемотаксу (P2Y₁₂R, P2X₄R, A₃R, A_{2A}R) и фагоцитозу (P2X₇R, P2Y₂R, P2Y₆R) код микроглије.

Коначно, на основу добијених резултата и појединачних закључака формулисан је и један општи закључак да уочени временско-просторни образац неуродегенеративних промена хипокампуса изазваних интоксикацијом ТМК верно моделује патолошке промене код неуродегенеративних хуманих патологија које погађају хипокампус, попут Алцхајмерове болести или епилепсије, као и да је његова специфичност у односу на друге моделе неуродегенерације у водећој проинфламацијској улози астроцита. Промене на нивоу компоненти пуринске сигнализације јасно указују на улогу овог система у ексцитотоксичности и неуроинфламацији, а тиме и на њихов допринос неуродегенерацији.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Dragić M, Zarić M, Mitrović N, Nedeljković N, Grković I. Two Distinct Hippocampal Astrocyte Morphotypes Reveal Subfield-Different Fate during Neurodegeneration Induced by Trimethyltin Intoxication. *Neuroscience*. 2019 Dec 15;423:38-54. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.022. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31682945. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.10.022 (M22)(*Neurosciences*: 114/267; IF₂₀₁₈ = 3.244)
2. Dragić M, Zarić M, Mitrović N, Nedeljković N, Grković I. Application of Gray Level Co-Occurrence Matrix Analysis as a New Method for Enzyme Histochemistry Quantification. *Microsc Microanal*. 2019 Jun;25(3):690-698. doi: 10.1017/S1431927618016306. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30714562. (M21)(*Microscopy*: 2/10; IF₂₀₁₉=3.414)
3. Dragić M, Mitrović N, Adžić M, Nedeljković N, Grković I. Microglial- and Astrocyte-Specific Expression of Purinergic Signaling Components and Inflammatory

Mediators in the Rat Hippocampus During Trimethyltin-Induced Neurodegeneration. ASN Neuro. 2021 Jan-Dec;13:17590914211044882. doi: [10.1177/17590914211044882](https://doi.org/10.1177/17590914211044882). PMID: 34569324; PMCID: PMC8495514. (M22)(Neurosciences: 108/273; IF₂₀₂₀=4.146)

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Ivana Grković, **Milorad Dragić**, Nataša Mitrović, Marina Zarić, Marija Adžić, Nadežda Nedeljković (2019). Expression of ecto-5' nucleotidase on amoeboid microglia during neurodegeneration induced by trimethyltin indicates its role in phagocytosis. Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, Belgrade, Serbia, December 6-8, Book of Abstracts, Session 7; (M34)
2. **Milorad Dragić**, Nataša Mitrović, Nadežda Nedeljković, Ivana Grković (2019) Concomitant up-regulation of ecto-5' nucleotidase (CD73) and pro-inflammatory cytokines in neuroinflammatory model of hippocampal injury induced by trimethyltin. Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, Belgrade, Serbia, December 6-8, Book of Abstracts, Session 7; (M34)
3. Nataša Mitrović, **Milorad Dragić**, Marina Zarić, Nadežda Nedeljković, Ivana Grković (2019) Flaxseed oil modulates microglia activation in the hippocampus of ovariectomized rats following trimethyltin intoxication. Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, Belgrade, Serbia, December 6-8, Book of Abstracts, Session 7; (M34)
4. Ivana Grković, **Milorad Dragić**, Nataša Mitrović, Marina Zarić, Dunja Drakulić, Nadežda Nedeljković (2019). Up-regulation of ecto-5' nucleotidase on activated microglial cells following trimethyltin-induced neurotoxicity of female rats. FENS Regional Meeting 2019, Belgrade, Serbia, July 10-13, Book of Abstracts, P266. (M34)
5. **Dragić Milorad**, Mitrović Nataša, Nadežda Nedeljković, Ivana Grković (2019). Trimethyltin-induced neurodegeneration is associated with gradual up-regulation of ecto-5' nucleotidase on activated microglia. 13th Gottingen Meeting of the German Neuroscience Society, Gottingen, Germany, March 20-23, Book of Abstracts, T11-2B; (M34)
6. **Dragić M**, Mitrović N, Drakulić D, Zarić M, Gusevac Stojanović I, Martinović J, Grković I (2018). Histochemical characterization of trimethyltin-induced neurodegeneration in CA1 hippocampal region of ovariectomized female rat. 11th FENS forum of Neuroscience, Berlin, Germany, July 7-11, Abstract book, C130; (M34)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Milorad Dragić**, Marina Zarić, Nataša Mitrović, Ivana Grković (2018) Morfološka karakterizacija hipokampalnih astrocita ovarijektomisanih ženki pacova u modelu neurodegeneracije izazvane trimetil-kalajem. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Septembar 25-30, Knjiga sažetaka, Usmeno izlaganje; (M62)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Милорада М. Драгића Б3009/2017 послата је на софтверску проверу оригиналности 26.10.2021.

Мишљење и предлог Комисије

Анализом докторске дисертације, Комисија је закључила да је докторска дисертација Милорада Драгића припремљена у виду скупа од три објављена научна рада из категорија 1×M21 и 2×M22 који представљају тематску целину, чиме су испуњени неопходни услови из члана 21, став 4, Правилника о докторским студијама Биолошког факултета Универзитета у Београду за тезе овог типа. Комисија сматра да ова докторска дисертација у целини представља оригиналан научни допринос у области неуродегенерације и да доприноси разумевању улоге глијских ћелија, као и пуринске сигнализације у неуродегенеративним променама на нивоу хипокампуса. Приказани резултати потенцијално могу имати и шири значај с обзиром да уочени образац неуродегенерације и пратећих промена понашања одговара променама карактеристичним за хумане неуродегенеративне патологије праћене неуроинфламацијом, пре свега Алцхајмерову болест.

Имајући у виду претходно наведено, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај Комисије о докторској дисертацији Милорада Драгића под насловом „Улога пуринског сигналног система у процесима неуродегенерације и неуроинфламације изазваних триметил-калајем у хипокампусу женки пацова“ и да га проследи Већу области природних наука Универзитета у Београду на усвајање.

КОМИСИЈА:

У Београду, 15.11.2021. године

др Тихомир Илић, редовни професор,
Медицински факултет Војномедицинске академије

др Данијела Лакета, ванредни професор,
Биолошки факултет Универзитета у Београду

др Наташа Митровић, научни сарадник,
Институт за нуклеарне науке „Винча“,
Институт од националног значаја за Републику Србију