

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.06.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Павла Анђуса, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, о урађеној докторској дисертацији **Стефана Стаменковића**, истраживача сарадника Центра за ласерску микроскопију Биолошког факултета Универзитета у Београду

**“Испитивање раних маркера процеса неуроинфламације и оксидативног стреса у мозгу трансгеног hSOD1 G93A пацова као експерименталног модела амиотрофичне латералне склерозе”**

и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. проф. др Павле Р. Анђус, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
2. проф. др Милош Мојовић, ванредни професор, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду
3. др Тања Дучић, виши научни сарадник, “CELLS - ALBA Synchrotron light source”, Барселона, Шпанија

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Стефана Стаменковића**, написана је на 128 страна текста и садржи 33 слике и 5 табела. Текстова докторске дисертације се састоји од 7 поглавља и то: Увод (20 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (24 стране), Резултати (31 страна), Дискусија (20 страна), Закључци (2 стране)

и Литература (30 страна).

Експериментални део ове докторске дисертације је урађен у Центру за ласерску микроскопију Биолошког факултета Универзитета у Београду у оквиру пројекта ИИИИ41005 финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под непосредним руководством др Павла Анђуса, ЕПР центру, Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду под руководством др Милоша Мојовића, Фраунхофер Институту за хелијску терапију и имунологију, Лајпциг, Немачка, под руководством др Александра Кранца и Институту ALBA Synchrotron light source, Cerdanolla del Valles, Барселона, Шпанија, под руководством др Тање Дучић.

**Главни предмет** истраживања ове докторске дисертације је међусобна узрочно-последична и временска повезаност различитих патофизиолошких механизма у моделу hSOD1 G93A амиотрофичне латералне склерозе (АЛС). Прецизније, предмет ове докторске дисертације је утврђивање раних маркера и повезаности неколико кључних патофизиолошких процеса током развоја и прогресије ове болести, са посебним освртом на улогу астроцита у наведеним процесима. Праћење активације и пролиферације глијалних хелија, промена у пропустљивости крвно-мождане баријере, као и промене параметара редокс статуса у možданом ткиву hSOD1 G93A пацова, ради бољег увида у механизам настајања обољења, идентификацију потенцијалних биомаркера болести и могућих терапеутских мета.

**Циљеви истраживања** ове докторске дисертације су били да се испита:

- Рани маркери и регионални профил активације и пролиферације астроцита и микроглије у možданом ткиву hSOD1G93A пацова и међусобни временски след активације ове две групе глијалних хелија.
- Повезаност унутархелијске акумулације SOD1 са активацијом и патофизиолошким утицајем глијалних хелија.
- Рани маркери и регионални профил промене интегритета крвно-мождане баријере и редокс статуса у možданом ткиву hSOD1 G93A пацова.
- Допринос редокс активних метала у промени редокс статуса možданог ткива hSOD1G93A пацова.
- Унутархелијска структура као и проинфламаторна и прооксидативна својства

астроцита изолованих из можданог ткива hSOD1 G93A пацова.

## АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **Уводу** је описана истраживана неуропатологија, амиотрофична латерална склероза, смртоносно неуродегенеративно обољење које погађа моторне и когнитивне домене централног нервног система. Описани су главни генетички фактори у АЛС и истакнуто да мутације у гену за Cu, Zn-супероксид дисмутазу (СОД1) узрокују 20% фамилијалних случајева АЛС и изазивају стварање унутарћелијских СОД1 агрегата и смањено везивање Cu и Zn, што доводи до патолошких унутарћелијских промена и неуродегенерације. Истакнут је патофизиолошки значај глијалне активације, поремећене хомеостазе прелазних метала, као и оштећење крвно-мождане баријере (КМБ) и повећане производње реактивних кисеоничних врста.

У делу **Циљ** истраживања кандидат се фокусира на испитивање наведених патолошких промена у моторним (мождано стабло) и не-моторним (хипокампус) центрима у мозгу трансгеног hSOD1 G93A модела АЛС пацова, у пресимптоматском и симптоматском стадијуму болести, како би се детаљније проучили ови патофизиолошки механизми и идентификовале ране промене у болести.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су изложени и илустровани: поступци који су били рађени са гајењем и идентификацијом пацова Sprague-Dawley дивљег соја (контролне животиње) и трансгеним Sprague-Dawley hSOD1 G93A пацовима, у пресимптоматској (преАЛС животиње) и симптоматској (АЛС животиње) фази болести. Описано је и како ће се за *in vitro* експерименте користити примарне ћелијске културе кортикалних астроцита изоловане из истих лабораторијских Sprague-Dawley пацова дивљег соја (контролни астроцити) и трансгених Sprague-Dawley hSOD1 G93A пацова (АЛС астроцити) старости 1 до 2 дана.

Од Метода примењених за *ex vivo* експерименте описане су:

Флуоресцентно обележавање короналних можданих пресека можданог стабла и хипокампуса контролних, преАЛС и симптоматских АЛС животиња антителима за маркере неурона, астроцита, микроглије и SOD1 протеин методом индиректне

имунохистохемије, и њихово осликавање конфокалном ласерском скенирајућом микроскопијом, као и постпроцесовање тродимензионалних снимака помоћу IMARIS софтвера.

- Праћење производње супероксидног радикала, количине нитрата, индекса липидне пероксидације и активности ензима антиоксидативне заштите SOD1 и SOD2 у хомогенатима možданог стабла и хипокампуса контролних, преАЛС и симптоматских АЛС животиња спектрофотометријским биохемијским тестовима.

- Праћење дистрибуције цинка, бакра, гвожђа, никла, мангана и других хемијских елемената у короналним možданим пресецима možданог стабла и хипокампуса контролних и АЛС животиња методом Рентгенске флуоресцентне микроскопије.

*In vivo* експерименти су подразумевали:

- Испитивање редокс статуса мозга и интегритета крвно-мождане баријере праћењем кинетике редукције спинских проба TEMPOL, 3-Carbamoyl-Proxyl и 3-Carboxy-proxyl у глави контролних, преАЛС и АЛС животиња помоћу ЕПР спектроскопије,

- Испитивање интегритета крвно-мождане баријере осликавањем магнетном резонанцијом уз употребу гадолинијумског контрастног агенса Дотарем.

*In vitro* експерименти су подразумевали:

- Праћење унутарћелијске дистрибуције SOD1 протеина у контролним и АЛС астроцитима, као и потврђивање чистоће ћелијске културе, методом индиректне имуноцитохемије са антителима за маркере астроцита, микроглије и SOD1 протеина.

- Испитивање кинетике продукције слободних радикала од стране контролних и АЛС астроцита након стимулације водоник-пероскидом праћењем промене интензитета флуоресцентне динамичке боје MitoSoxRed на конфокалном ласерском скенирајућем микроскопу.

- Испитивање унутарћелијске структуре контролних и АЛС астроцита помоћу микроскопије Рентгенским зрацима ниских енергија.

У поглављу **Резултати** истичу се глијална пролиферација и прогресивно накупљање СОД1 у ткиву у оба испитивана мождана региона hSOD1 G93A пацова, који почињу већ у пресимптоматској фази. У можданом стаблу ових животиња активација астроцита је била присутна пре почетка симптома болести, и била је праћена активацијом микроглије. Такође, у можданом стаблу астроцити су показали прогресивну акумулацију СОД1 протеина у ћелијском телу и наставцима, док су нивои СОД1 у микроглији били смањени, а њена дистрибуција ограничена на дисталне ћелијске наставке. У хипокампусу hSOD1 G93A пацова астроцити су показали исти реактивни профил као онај уочен у можданом стаблу, док је морфологија микроглије била непромењена. У овом региону мозга оба типа глијалних ћелија су показала акумулацију СОД1 протеина у ћелијском телу. У посебном поглављу Резултата приказана је топографска и квантитативна анализа елементарног састава ткива помоћу Рентгенске флуоресцентне микроскопије која је показала смањење у количини фосфора, а повећање концентрације елемената Са, Cl, K, Ni, Cu и Zn у можданом стаблу, као и повећане нивое Cl, Ni, Cu, а смањење Zn у хипокампусу симптоматских hSOD1 G93A пацова.

У посебном делу Резултата дати су налази редокс статуса можданог ткива и интегритета КМБ у hSOD1 G93A пацова испитаних *in vivo* ЕПР спектроскопијом коришћењем 3 аминоксил радикала са различитим способностима проласка кроз ћелијску мембрану и КМБ - Темпола, 3-карбамоил-проксила (3 CP), и 3-карбокси-проксила (3CхP). Уводни, методски резултати су указали да је 3CP најприкладнији за испитивање унутарћелијског редокс статуса. Фармакокинетичко моделовање редукације 3CP *in vivo* са главе пресимптоматских и симптоматских hSOD1 G93A пацова указало је на измењен редокс статус можданог ткива и могуће оштећење КМБ у овим животињама. Измењен редокс статус у мозгу hSOD1 G93A пацова је потврђен биохемијским есејима који су показали повећану нитрилацију, производњу супероксидног радикала, липидну пероксидацију и активност СОД2, као и смањену активност СОД1 у хомогенатима ткива можданог стабла и хипокампуса ових животиња. Оштећење КМБ је потврђено осликавањем магнетном резонанцијом које је показало цурење КМБ већ код пресимптоматских животиња, уз даље ширење оштећења код симптоматских пацова.

Ови резултати доносе нови увид у глијални одговор и промене у хомеостази

различитих елемената током развоја и прогресије болести у моторним и не-моторним структурама ЦНС, и указују на поремећен редокс статус мозга и оштећење КМБ као ране маркере болести.

У **Дискусији** подељеној на 2 дела: Телијске и унутарћелијске промене у мозгу hSOD1 G93A пацова, и Промена редокс статуса и повећање пропустљивости КМБ у мозгу hSOD1 G93A пацова, кандидат је показао познавање литературе везане за испитивану проблематику и указао на све значајне и нове доказе ове докторске дисертације са критичким освртом на резултате других најновијих истраживања у овој научној области. У овом поглављу као и у наредном **Закључци** кандидат истиче да ови резултати доносе нови увид у глијални одговор и промене у хомеостази различитих елемената током развоја и прогресије АЛС у моторним и не-моторним структурама ЦНС и да указују на поремећен редокс статус мозга и оштећење КМБ као ране маркере болести.

У поглављу **Литература** наведенесу **295** релевантне библиографске јединице, што указује да је кандидат темељно и студиозно приступио изучавању проблематике докторске дисертације.

## **БИБЛИОГРАФИЈА**

**Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. **Stamenković S**, Dučić T, Stamenković V, Kranz A, Andjus PR. Imaging of glial cell morphology, sod1 distribution and elemental composition in the brainstem and hippocampus of the ALS hSOD1(G93A) rat. *Neuroscience*. 2017 doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.041. **(M22)**
2. **Stamenković S**, Pavićević A, Mojović M, Popović-Bijelić A, Selaković V, Andjus P, Bačić G. In vivo EPR pharmacokinetic evaluation of the redox status and the blood brain barrier permeability in the SOD1(G93A) ALS rat model. *Free Radic Biol Med*. 2017 108:258-269 **(M21)**

### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. Andjus PR, Bataveljic D, **Stamenkovic S**, Bacic G. Imaging cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of ALS. The European Glial Cell Meeting – EUROGLIA, and COST BM0603 Action Inflammation in Brain Disease (NEURINFNET) Meeting, September 8-12, 2009. Paris, France. Abstract No. 469
2. **Stamenkovic S**, Bataveljic D, Andjus PR. Neuroinflammation and cellular response in the brainstem and hippocampus of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat model of amyotrophic lateral sclerosis. 8th FENS Forum of Neuroscience, July 14-18, 2012. Barcelona, Spain, poster: C147.
3. **Stamenkovic S**, Ducic T, Kranz A, Selakovic V, Radenovic L, Andjus PR. Glial activation and metal imbalance as causes of oxidative stress in the SOD1 G93A transgenic rat model of ALS. FENS featured regional meeting 2013, Prague, Czech Republic, 11.09. - 14.09.2013. Poster number: PIII-C-041.
4. **Stamenkovic S**, Selakovic V, Radenovic L, Andjus PR. Glial activation and oxidative stress in the ALS SOD1 G93A transgenic rat model. SiNAPSA Neuroscience Conference 2013, Ljubljana, Slovenia, 27.09. - 29.09.2013. Poster number: CEL-B03.
5. **Stamenkovic S**, Ducic T, Kranz A, Bataveljic D, Selakovic V, Radenovic L, Andjus PR. Oxidative stress in the SOD1 G93A transgenic rat model of ALS: Subcellular details of glial activation and X-ray analysis of metal imbalance. Society for Neuroscience Annual Meeting 2014. 15.11. - 19.11.2014. Washington, DC, USA. Poster number: 696.02
6. **Stamenkovic S**, Ducic T, Selakovic V, Mojovic M, Pavicevic A, Popovic-Bijelic A, Radenovic L, Bacic G, Andjus PR. Studies of the oxidative status in the brain of the hSOD1G93A ALS rat. SiNAPSA Neuroscience Conference 2015. Ljubljana, Slovenia, September 15 - 17.05.2015. Poster number MOL.10.
7. **Stamenkovic S**, Ducic T, Kranz A, Selakovic V, Radenovic L, Andjus PR. 3D investigation of glial activation and X-ray analysis of metal imbalance in the SOD1 G93A transgenic rat model of ALS. FENS Featured Regional Meeting, Thessaloniki, Greece. 7 - 10.10.2015.
8. **Stamenković S**, Dučić T, Stamenković V, Kranz A, Andjus PR. Changes in glial cell morphology, SOD1 distribution and elemental composition in the brain of the ALS hSOD1<sup>G93A</sup> rat. 12th annual meeting of the European Society for Molecular Imaging – EMIM 2017, 5 - 7.4.2017. Cologne, Germany. Poster number PW 08/75.
9. **Stamenković S**, Dučić T, Stamenković V, Kranz A, Andjus PR. Glial cell morphology, intracellular SOD1 distribution and elemental composition in the brainstem and hippocampus of the transgenic rat model of ALS. ENCALS meeting 2017, 18 - 20.5.2017. Ljubljana, Slovenia. Poster number P95.

10. **Stamenković S**, Jovanović M, Daković M, Selaković V, Andjus PR. Blood-brain barrier disruption, redox status and elemental composition in the brain of the transgenic rat model of ALS. 11<sup>th</sup> European Biophysics Congress, 16 - 20. 7.2017. Edinburgh, UK. Poster number P-875.
11. Popović-Bijelić A, Pavićević A, **Stamenković S**, Andjus PR, Mojović M. *In vivo/ex vivo* EPR spectroscopy in the study of amyotrophic lateral sclerosis. 11<sup>th</sup> European Biophysics Congress, 16 - 20. 7.2017. Edinburgh, UK. Poster number P-867.

#### **Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја**

1. **Stamenkovic S**, Bataveljic D, Radenovic L, Andjus PR. Cellular markers of neuroinflammation in the brain of the hSOD1<sup>G93A</sup> rat model of ALS. 2<sup>nd</sup> Congress of Physiological Sciences of Serbia with International participation on "Current trends in Physiological Sciences", September 17-20, 2009. Kragujevac, Serbia. P170.
2. **Stamenkovic S**, Selakovic V, Radenovic L, Andjus PR. Activation of glial cells and oxidative stress in the hippocampus and brainstem of the transgenic SOD1 G93A rat model of ALS. 6<sup>th</sup> congress of the Serbian Neuroscience Society. Belgrade, Serbia, 15 - 16.11.2013. Poster number: P3-36.
3. **Stamenkovic S**, Ducic T, Kranz A, Andjus PR. (2015). Imaging glial activation and tissue metal composition in amyotrophic lateral sclerosis. 5<sup>th</sup> international School and Conference on Photonics. 24 - 28.09.2015. Belgrade, Serbia. Poster number: P.BP.19.

### **МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ**

Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Стефана Стаменковића** под насловом „**Испитивање раних маркера процеса неуроинфламације и оксидативног стреса у мозгу трансгеног hSOD1 G93A пацова као експерименталног модела амиотрофичне латералне склерозе**“, сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим сазнањима, новој методологији и да је адекватно и прецизно спроведено. Добијени резултати су прегледни, јасни, веома добро и критички продискутовани и представљају значајан допринос откривању раних ћелијских, молекуларних, као и биофизичких маркера АЛС.

Резултати истраживања ове докторске дисертације публиковани су у 2 рада у међународним часописима, и представљени су у форми саопштења на 11 међународних и 3 домаћа научна скупа.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета



Универзитета у Београду да прихвати Извештај о урађеној докторској дисертацији **Стефана Стаменковића**, и овај рад узме као основ за јавну одбрану и стицање звања доктора биолошких наука.

У Београду, 07. 07. 2017.год.

**КОМИСИЈА:**

др Павле Анђус, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Милош Мојовић, ванредни професор,  
Факултета за физичку хемију, Универзитета у  
Београду

др Тања Дучић, виши научни сарадник,  
"CELLS - ALBA Synchrotron light source",  
Барселона, Шпанија