

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду -Биолошког факултета, одржаној 10.05.2019. године, на основу молбе ментора, Селме Каназир, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ и *Roosmarijn Vandembroucke*, ванредног професора Фламманског института за биотехнологију, Центра за истраживање инфламације, Универзитета у Генту, Белгија, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Марјане П. Бркић, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под насловом: „Значај структурних и функционалних промена хороидног плексуса миша у иницијацији неуроинфламације“, у саставу:

Др Селма Каназир, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Др *Roosmarijn Vandembroucke*, ванредни професор, Фламмански институт за биотехнологију, Центар за истраживање инфламације, Универзитет у Генту, Белгија

Др Надежда Недељковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

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

Др *Claude Libert*, редовни професор, Фламмански институт за биотехнологију, Центар за истраживање инфламације, Универзитет у Генту, Белгија

Др *Tirsa van Westering*, постдокторски истраживач, Фламмански институт за биотехнологију, Центар за истраживање инфламације, Универзитет у Генту, Белгија

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду -Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Марјане П. Бркић под насловом „Значај структурних и функционалних промена хороидног плексуса миша у иницијацији неуроинфламације“ написана је на 145 страна, садржи 4 табеле и 35 слика, и листу од 284 библиографских јединица које су цитиране у раду. Докторску дисертацију чине: Насловна страна на енглеском и српском језику,

Подаци о менторима и члановима комисије, Захвалница, Резиме на енглеском, српском и фламанском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима (Увод – 34 стране; Циљ рада – 3 стране; Материјал и методе – 14 страна; Резултати – 33 стране; Дискусија – 20 страна; Закључак – 3 стране; Литература – 38 страна) и Прилози (Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу).

Анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације, кандидат Марјана П. Бркић описује баријере централног нервног система (ЦНС), са акцентом на крвно-ликворну баријеру (КЛБ). Затим, кандидат детаљно објашњава морфологију и улоге епителних ћелија хороидног плексуса (ЕЋХП), као главних конституивних јединица КЛБ. Даље, кандидат наводи различите функције хороидног плексуса (ХП), и посебно описује секреторну функцију, сходно томе да ХП представља место синтезе различитих биолошки активних молекула, за које је показано да играју значајну улогу у процесима неуроинфламације. Након тога, детаљније је објашњен феномен инфламације, дат је општи преглед сазнања из ове области и описан процес акутне инфламације, као и прелазак у хронично инфламаторно стање организма. Додатно, кандидат детаљно обрађује различите инфламаторне медијаторе, који су одговорни за комплексни процес регулације инфламаторног одговора. Посебна пажња је поклоњена цитокинима, као једним од кључних медијатора процеса инфламације. Наведене су и описане различите групе цитокина, као и специфичне улоге појединачних цитокина, њихова места синтезе и таргети. Матриксне металопроотеиназе (ММП) су такође обрађене са аспекта њихове улоге у процесима инфламације, а посебно је истакнут њихов утицај у овом контексту на различите цитокине. Потом, кандидат описује ванћелијске везикуле и њихову улогу у различитим неуродегенеративним и инфламаторним обољењима централног нервног система. Указује и на важност различитог каргоа који се налази у њиховој унутрашњости, као што су микро РНК, за које је показано да имају важно регулаторно дејство у инфламаторним процесима. Након тога, кандидат даје посебан осврт на процесе неуроинфламације, описујући детаљније микроглију, као кључног актера у овом процесу, као и однос микроглије и различитих цитокина у контексту неуроинфламације. Затим су наведене и различите болести које су асоциране са процесом неуроинфламације, а посебно су обрађене две болести из тог угла - сепса и Алцхајмерова болест. На крају овог поглавља, дат је преглед литературних података који истичу улогу хороидног плексуса у процесима неуроинфламације.

У поглављу **Циљеви истраживања** кандидат полази од нових сазнања која показују улогу ХП у процесу неуроинфламације, кроз промене морфологије и функције ЕЋХП. Сходно томе да је улога ХП у процесима иницијације неуроинфламације још увек нејасна, кандидат поставља као главни циљ ове тезе истраживање улоге ХП у процесу иницијације неуроинфламације у два различита модела болести у којима се јавља процес неуроинфламације. Затим, кандидат укратко објашњава та два модела, тј. модел липополисахаридом (ЛПС) индуковане сепсе, и други модел интрацеребровентрикуларно (и.ц.в) ињецираних амилоид бета олигомера (А β О), као модела Алцхајмерове болести.

Сходно овом општем циљу, кандидат поставља и одређене специфичне циљеве истраживања и то: испитивање функционалности КЛБ, као и морфолошких промена ЕЋХП које се дешавају током иницијације неуроинфламације након и.ц.в. ињецирања А β О; утврђивање момента повећања проводљивости крвно моздане баријере у односу на КЛБ током иницијације неуроинфламације након и.ц.в. ињецирања А β О; процена ефекта и.ц.в. ињецираних А β О на понашање животиња; утврђивање механизма који доводе до промена у пропустљивости КЛБ након и.ц.в. ињецирања А β О; истраживање функционалних промена ХП током иницијације неуроинфламације након и.ц.в. ињецирања А β О и интраперитонеалног (и.п) ињецирања ЛПС, које се огледају у променама секреторне активности ЕЋХП; утврђивање тренутка активације микроглијских ћелија након и.ц.в. ињецирања А β О.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно је изложена организација експеримента, подела експерименталних животиња у експерименталне групе и протоколи за све примењене технике, као и статистичка обрада добијених резултата. Све експерименталне процедуре су спроведене у сагласности са Директивом 2010/63/ЕУ о заштити животиња које се користе у експерименталне и научне сврхе и одобрене од стране етичког комитета Факултета науке, Универзитета у Генту (ЕЦ 2013-077).

У експерименту су коришћене женке мишева C57BL/6 соја, старости 8-10 недеља, као и ММП3-дефицијентни мишеви, C57BL/6 порекла. Коришћена су два различита анимална модела болести, модел системске инфламације и модел Алцхајмерове болести. У моделу системске инфламације, јединке су подвргнуте и.п. ињецирању ЛПС, док су контролне животиње добиле фосфатни пуфер. Други модел који је коришћен је модел Алцхајмерове болести, за који су посебно припремљени олигомери амилоида бета, који су ињецирани и.ц.в., док је контролној групи и.ц.в. ињецирани скрембловани пептид.

Понашање експерименталних животиња, у моделу Алцхајмерове болести, је испитано коришћењем теста препознавања новог објекта. Тест је рађен током три дана, кроз три фазе:

хабитуације, тренинг фазе и фазе тестирања. Тестирана је краткотрајна меморија, као и дуготрајна меморија. Експеримент је сниман камером и снимак даље анализиран од стране експериментатора.

Ради различитих анализа цереброспиналне течности (ЦСТ), као и можданог ткива, животиње су подељене у групе које су жртвоване или 2 сата или 6 сати након ињектирања инфламаторног стимулуса. Непосредно пре жртвовања експерименталним животињама је изолована ЦСТ из велике цистерне. Церебро-спинална течност је даље коришћена за одређивање степена пропустљивост КЛБ и крвно-мождане баријере (КМБ). Такође, из ЦСТ су одређени и нивои различитих цитокина, уз помоћ *Bio-Plex* есеја. Анализа активности ММП у ЦСТ је урађена коришћењем *Omni-MMP* кита са флуорогеним супстратом. Додатно, у ЦСТ је одређен и ниво партикула, које укључују и ванћелијске везикуле, уз помоћ софтвера за анализу нанопартикула.

Хипокампус и ХП експерименталних животиња је изолован за даљу анализу експресије различитих гена и микро РНК, методом квантитативне ланчане реакције полимеразе. Анализирани гени у ЕЋХП укључују гене чији протеински производи чине градивне јединице чврстих веза, пукотинастих и појасних веза (*Cldn-1, Cldn-5, Ocln, Zo1, Cx43, N-cdh, E-cdh*); гене чији су протеински производи важни биолошки активни молекули секретовани од стране ЕЋХП, као што је неуротрофички фактор раста пореклом из мозга (*Bdnf*); затим различити гени чији протеински производи представљају медијаторе инфламације (*Il1 β , Il6, Tnf, Mmp3, Mmp8, Mmp9*), као и маркере ванћелијских везикула (*Cd63*). Додатно, анализирана је и експресија микро РНК *miR-155*.

Ради хистолошке анализе, цели мозгови животиња су замрзавани у криопротектанту. Пресеци су након имунохистохемијских бојења анализирани на конфокалном микроскопу. За детекцију циљних протеина, међу којима су конституенти чврстих веза (OCLN, ZO1), као и један од најсекретованијих протеина ХП (TTR), коришћена су специфична примарна антитела. У циљу анализе броја микроглијских ћелија, након адекватне обраде читави мозгови су били потопљени у парафин. Микроглијске ћелије су обележене помоћу примарног антитела IBA1 и касније посматране уз помоћ светлосне микроскопије. Морфолошка анализа ХП је урађена путем серијске блок-фејс скенирајуће електронске микроскопије.

Добијени резултати су статистички обрађени у *GraphPadPrism* софтверском пакету (San Diego, CA) и представљени као средња вредност мерених параметара \pm стандардна грешка.

У поглављу **Резултати** експериментално добијени подаци су класификовани у логично организоване целине и јасно графички приказани. Након и.ц.в ињектирања АВО, праћењем нивоа флуоресцеинизотиоцијанат-декстрана (ФИТЦ-декстран) у ЦСТ, показано је да се у шестом сату након третмана значајно повећава пропустљивост КЛБ у односу на контролу. Даљим тестирањем, у временским тачкама након 24 и 48 сата, као и седам дана, уочена је пролазност промене пропустљивости КЛБ, с обзиром да се ниво ФИТЦ-декстрана у ЦСТ вратио на базални ниво

недељу дана након и.ц.в ињектирања АβО. Праћењем морфолошких промена ЕЋХП 6 сати након и.ц.в ињектирања АβО путем електронске микроскопије, примећено је да су ЕЋХП изгубиле карактеристични кубоидни облик, чији је губитак доведен у везу са смањеном генском и протеинском експресијом компоненти чврстих веза. Додатно је показано да нема промена на нивоу генске и протеинске експресије протеина који граде пукотинасте и појасне везе. Када је испитана пропустљивост КМБ у шестом сату након третмана, није уочена значајна промена нивоа ФИТЦ-декстрана у мозданом ткиву животиња и.ц.в ињектираних АβО, у односу на контролне, као ни промене генске експресије истих компоненти чврстих веза, осим у случају *Cldn-5*. Што се тиче ефеката и.ц.в ињектираних АβО на понашање животиња, тестираних кроз тест препознавања новог објекта, уочен је когнитивни дефицит, како у краткотрајној, тако и у дуготрајној меморији, у односу на контролне животиње.

Испитивањем механизма који леже у основи показане повећане пропустљивости КЛБ шест сати након и.ц.в ињектирања АβО, уочено је повећање нивоа генске експресије ММП у хороидном плексуу у односу на контролу. Додатно, у истој временској тачки је примећена и значајно повећана активност ММП у ЦСТ третираних животиња у односу на контролу. Применом инхибитора ММП широког спектра, овај ефекат је био анулиран, тачније испитивани нивои активности ММП код третираних животиња су били једнаки базалним. Како би се утврдио допринос ММП повећању пропустљивост КЛБ након и.ц.в ињектирања АβО, испитан је утицај примене инхибитора ММП широког спектра на пропустљивост КЛБ. Примећено је да оваква примена ММП широког спектра доводи до значајног смањења пропустљивости КЛБ. Када се упореди ниво пропустљивости КЛБ након и.ц.в ињектирања АβО, ниво пропустљивости остаје и даље значајно повећан у односу на контролни. Допринос ММП3 повећању пропустљивости након и.ц.в ињектирања АβО је додатно испитан коришћењем ММП3 дефицијентних мишева, код којих је примећено да је након третмана значајно мања пропустљивост КЛБ у односу на C57BL/6 мишеве. Додатно је уочено да пропустљивост КЛБ након и.ц.в ињектирања АβО код ММП3 дефицијентних мишева је и даље на значајно вишем нивоу у односу на ММП3 дефицијентне мишеве ињектиране контролним пептидом.

Што се тиче секреторне активности ЕЋХП, резултати су показали да нема промене у генској и протеинској експресији TTR, док је примећен пад у генској експресији *Bdnf* у ЕЋХП, као и у његовој протеинској концентрацији у ЦСТ.

Испитивањем генске експресије великог броја цитокина у ЕЋХП и њихове протеинске концентрације у ЦСТ, примећено је да већина испитаних цитокина показује значајан пораст већ у другом сату након и.ц.в ињектирања АβО, док је ефекат у шестом сату још израженији. Сличан ефекат је примећен и у случају генске експресије проинфламаторних цитокина у хипокампусу.

Праћењем броја партикула у ЦСТ, уочено је да се након и.ц.в ињедирања АβО само у шестом сату јавља значајно повећање њиховог броја код третираних животиња у односу на контролне. Испитивањем овог феномена у додатним временским тачкама, тј. након 24 и 48 сати, као и након 7 дана, уочена је пролазност промене и враћање на контролни ниво недељу дана након третмана, што се подудара са временским оквиром промена пропустљивости КЛБ. Сличан ефекат је показан и у моделу и.п. ињедирања ЛПС, у смислу значајног повећања броја партикула у ЦСТ код третираних мишева, посебно у шестом сату након третмана. Додатно, испитан ниво генске експресије *Cd63*, једног од маркера ванћелијских везикула, показао је значајан пораст у ЕЋХП, како код животиња и.ц.в ињедираних АβО, тако и код и.п. ЛПС ињедираних животиња у шестом сату након третмана. Исти образац промена уочен је и на нивоу експресије *miR-155* у оба анимална модела. На крају поглавља је показано да микроглија није значајно активирана у процесу иницијације неуроинфламације у шестом сату након третмана.

У **Дискусији** добијених резултата кандидат је објаснио детектоване промене уочене током процеса иницијације неуроинфламације на нивоу КЛБ, као и у самом ХП, тј. у ЕЋХП, како у анималном моделу Алцхајмерове болести, тако и у ЛПС индукованом моделу сепсе. Кандидаткиња је кроз дискусију упоредила ове промене и са другим болестима повезаним са процесима неуроинфламације, како би указала на стереотипан одговор хородиног плексуса као релејне станице између периферије и ЦНС-а, као и структуре одговорне за имунски надзор у мозгу, која игра кључну улогу у процесу иницијације неуроинфламације.

Сходно чињеници да је КЛБ препозната као место уласка имунских ћелија у мозак у процесу неуроинфламације, што изискује повећање пропустљивости КЛБ и промене морфологије ЕЋХП у самој иницијацији овог процеса, посебна пажња је посвећена дискутовању ових резултата, како у контексту испитиваног модела Алцхајмерове болести, и модела ЛПС индуковане сепсе, тако и у ширем контексту осталих болести повезаних са неуроинфламацијом. Резултати првог тематског дела овог поглавља су по први пут показали у једном анималном моделу Алцхајмерове болести, да након и.ц.в ињедирања АβО долази до повећане пропустљивости КЛБ, као и морфолошких промена ЕПЋХ, у основи којих лежи смањење генске и протеинске експресије чврстих веза у ЕЋХП. Изостанак сличних промена у датој временској тачки на КМБ, указао је на важност КЛБ у овим процесима у односу на значајно више проучавану КМБ. .

Други тематски део овог поглавља је посвећен дискутовању резултата који се односе на промене функционалности ХП у два наведена анимална модела болести, који се огледају у променама секреторне активности ЕЋХП. Уочени повећан ниво експресије цитокина за које се сматра да су одговорни за амплификавање инфламаторног одговора, са циљем привлачења додатних имунских ћелија на место инфламације, упоређен је са осталим моделима асоцираним са

неуроинфламацијом, што је још једном указало на сличност реаговања ХП на инфламаторни стимулус у различитим болестима, без обзира на порекло стимулуса. Додатно, у овом одељку су дискутовани и резултати који указују да повећање нивоа експресије ММП лежи у основи механизма који доводи до повећане пропустљивости КЛБ у моделу Алцхајмерове болести. Штавише, указано је на појаву измењене секреторне активност ХП у виду повећане продукције и секреције ванћелијских везикула, као важног регулатора процеса неуроинфламације, кроз присутност про-инфламаторног садржаја унутар везикула, као што су одређене микро РНК.

У поглављу **Закључци** сумирани су и јасно наведени резултати добијени у овој докторској дисертацији.

У поглављу **Литература** наведене су 284 библиографске јединице, што указује да је кандидат темељно и студиозно приступио изучавању проблематике ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Brkic, M.**, Balusu, S., Van Wonterghem, E., Gorié, N., Benilova, I., Kremer, A., Van Hove, I., Moons, L., De Strooper, B., Kanazir, S. and Libert, C., 2015. Amyloid β oligomers disrupt blood–CSF barrier integrity by activating matrix metalloproteinases. *Journal of Neuroscience*, 35(37), pp.12766-12778. **M21a**
http://www.jneurosci.org/content/35/37/12766?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=JNeurosci_TrendMD_1
2. Steeland, S., Gorié, N., Vandendriessche, C., Balusu, S., **Brkic, M.**, Van Cauwenberghe, C., Van Imschoot, G., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., Kremer, A. and Lippens, S., 2018. Counteracting the effects of TNF receptor \square 1 has therapeutic potential in Alzheimer's disease. *EMBO molecular medicine*, 10(4), p.e8300. **M21a**
<http://embomolmed.embopress.org/content/10/4/e8300.abstract>
3. Balusu, S., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., Raemdonck, K., Stremersch, S., Gevaert, K., **Brkic, M.**, Demeestere, D., Vanhooren, V., Hendrix, A. and Libert, C., 2016. Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus \square derived extracellular vesicles. *EMBO molecular medicine*, 8(10), pp.1162-1183. **M21a**
<http://embomolmed.embopress.org/content/8/10/1162.abstract>
4. **Brkic, M.**, Balusu, S., Libert, C. and Vandenbroucke, R.E., 2015. Friends or foes: matrix metalloproteinases and their multifaceted roles in neurodegenerative diseases. *Mediators of inflammation*, 2015: 620581. **M22**
<https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/620581/abs/>
5. Balusu, S., **Brkic, M.**, Libert, C. and Vandenbroucke, R.E., 2016. The choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in Alzheimer's disease: more than just a barrier. *Neural regeneration research*, Apr;11(4):534-7.

B2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Brkic, M.**, Balusu, S., Van Wonterghem, E., Gorle, N., Benilova, I., Kremer, A., De Strooper, B., Kanazir, S., Libert, C., Vandenbroucke, R., Amyloid beta oligomers induce loss of blood-cerebrospinal fluid barrier integrity, 9th IBRO World Congress on Neuroscience, Rio de Janeiro, Brazil, 7-11 July 2015, poster 1117 **M34**
2. Balusu, S., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., Raemdonck, K., Stremersch, S., Gevaert, K., **Brkic, M.**, Demeestere, D., Vanhooren, V., Hendrix, A. and Libert, C., Extracellular vesicles from the choroid plexus propagate pro-inflammatory message in CNS upon peripheral inflammatory stimulus, ISEV 2015, Washington DC, USA 23 - 26 April, 2015, poster ABSSUB-482 **M34**
3. Balusu S, Wonterghem EV, Rycke RD, Raemdonck K, Stremersch S, Gevaert K, **Brkic M**, Demeestere D, Vanhooren V, Hendrix A, Libert C and Vandenbroucke RE, Extracellular vesicles from the choroid plexus propagate pro-inflammatory message in CNS upon peripheral inflammatory stimulus. Front. Neurosci. Conference Abstract: 11th National Congress of the Belgian Society for Neuroscience, 22 May 2015. doi: 10.3389/conf.fnins.2015.89.00085 **M34**

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију Марјане П. Бркић, која је прошла формалну проверу оригиналности и чији смо приказ дали у извештају, као и приложене библиографије и непосредног увида у њен рад, Комисија са задовољством констатује да приказани резултати представљају важан научни допринос бољем разумевању улоге хороидног плексуса у процесима неуроинфламације, који се одиграва кроз низ структурних и функционалних промена овог ткива.

Нарочити значај ове студије се огледа у разумевању процеса неуроинфламације који се јавља у Алцхајмеровој болести. Наиме, у овом раду је први пут показан директан ефекат и.ц.в ињецираних АВО, као инфламаторног стимулуса, на КЛБ. Такође, је описан је и механизам који лежи у основи повећане пропустљивости КЛБ током иницијације неуроинфламације, као и униформност одговора ХП у различитим болестима асоцираним са процесом неуроинфламације. Свеукупно, описане промене су указале на значајну улогу КЛБ и ХП у процесима неуроинфламације која до сада није била описана.

Кандидат је показао добро познавање литературе и проблематике релевантне научне области, као и висок степен истраживачке зрелости.

О резултатима добијеним у оквиру овог истраживања, интерпретацији и значају истих додатно говори податак да су објављени у три рада, у два врхунска међународна часописа M21a категорије (област неуронаука и молекуларне медицине), као и у два ревијска рада у часописима од међународног значаја.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације Марјане П. Бркић, под насловом „Значај структурних и функционалних промена хороидног плексуса миша у иницијацији неуроинфламације“, као и број и квалитет научних радова који су објављени на основу добијених резултата дисертације, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидата Марјане П. Бркић.

У Београду, 20.06.2019. године

КОМИСИЈА:

Др Селма Каназир, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Др Roosmarijn Vandenbroucke, ванредни професор Фламмански институт за биотехнологију, Центар за истраживање инфламације, Универзитет у Генту, Белгија

Др Надежда Недељковић, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

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

Др Claude Libert, редовни професор
Фламмански институт за биотехнологију, Центар за истраживање инфламације, Универзитет у Генту, Белгија

Др Tirsia van Westering, постдокторски истраживач
Фламмански институт за биотехнологију, Центар за истраживање инфламације, Универзитет у Генту, Белгија