

**Извештај о оцени докторске  
дисертације, доставља,-**

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МФ ВМА УО

Одлуком бр. 49/111 са 111. седнице Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду одржаној 28.09.2023. године, именована је комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације (у даљем тексту Комисија) под насловом:

**"Модулацијски ефекат интермитентног облика стимулације тета прасковима на оксидативно стање и активацију глије у селективно осетљивим можданим структурама на моделу стрептозотоцином изазване Алцхајмерове деменције".**

Кандидат је мастер биолог **Јелена Станојевић**, студент Докторских академских студија биомедицине - модул неуронауке, МФ ВМА УО, запослена у Војномедицинској академији у Београду.

**Ментор** у изради тезе је научни саветник доц. др Ивана Стевановић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

**Комисија у саставу:**

1. Проф. др сц. мед. Милица Нинковић, Медицински факултет ВМА УО, Институт за медицинска истраживања ВМА, Београд, председник комисије;
2. Проф. др сц. мед. Ивана Стојановић, Медицински факултет Универзитета у Нишу, Ниш, члан комисије;
3. Научни сарадник др Милорад Драгић, Биолошки факултет Универзитета у Београду, Београд, члан комисије

на основу анализе приложене докторске дисертације једногласно подноси Наставно-научном већу Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи извештај.

## ИЗВЕШТАЈ

### А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација мастер биолога Јелене Станојевић написана је на 118 страна и подељена на следећа поглавља: Увод (22 стране), Хипотеза и циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (19 страна), Резултати (29 страна), Дискусија (19 страна), Закључак (две стране) и Литература (24 стране). Увод садржи четири слике, а материјал и методе једну слику, једну шему и две табеле. Резултати су приказани кроз 25 слика и графикона, а у дискусији су приказане три слике. Цитирани су подаци из 329 референци. Рад садржи и сажетак на српском и енглеском језику, садржај, биографију аутора, као и податке о Комисији, чиме по структури има све елементе докторске дисертације.

Докторски рад приказује истраживање којим се прате неуропротективни и неуромодулаторни аспекти деловања транскранијалне магнетне стимулације (ТМС) на експерименталном моделу хумане Алцхајмерове болести (АБ) након интрацеребралне апликације стрептозотоцина.

У Уводу кандидат износи податке о АБ чија етиологија је непозната, али је идентификован велики број фактора ризика који повећавају шансе за настанак и прогресију ове болести. Имајући у виду деловање инсулина и присуство инсулинских рецептора у мозгу као и нарушену инсулинску сигнализацију у АБ, уведен је експериментални модел на пацову, у коме се интрацеребровентрикуларном (ицв) применом стрептозотоцина (СТЗ) индукују биохемијске промене (смањење метаболизма глукозе, редукција холинергичке трансмисије и повећање маркера оксидативног стреса), морфолошке промене (губитак неурона, астроглиоза и неуроинфламација) и бихејвиоралне промене (оштећење учења и памћења). Микроскопском анализом ткивних исечака мозга пацијената оболелих од АБ, као и можданих структура пацова након давања СТЗ, уочавају се бројне структурне промене од којих су најзначајније формирање сенилних плакова, неурофибриларне клубади, губитак синапси, оштећење неурона и активација ћелија глије. Показано је да повећана синтеза амилоидног прекурсорског протеина модулише бројне сигналне процесе, међу којима и транскрипцију гена за протеин одговора на рани фактор раста 1 (енг. *Early Growth Response Protein 1; EGR1*), чија активност регулише ниво бета амилоида, а чија супресија пак, ублажава патологију АБ. Са друге стране, метаболички фактори који се повезују са патогенезом АБ укључују настанак и одржавање стања оксидативног стреса, запаљенских процеса, промена у метаболизму протеина и липида, смањену активност митохондрија и присуство централне инсулинске резистенције, па се може говорити о и метаболичком поремећају који постоји у току развоја АБ. Механизам деловања СТЗ управо се заснива на изазивању централне инсулинске резистенције за коју је доказано да доводи до оксидативног стреса и инфламације што доприноси развоју амилоидне и тау патологије типичне за АБ. Сматра се да је оштећење изазвано ицв применом СТЗ резултат кумулативног ефекта енергетског дефицита, смањеног обрта ацетилхолина и синаптичке дисфункције, које се код пацова клинички испољавају смањењем капацитета за учење и памћење.

У циљу ублажавања или отклањања последица оксидативног стреса, ћелије теже да успоставе редокс равнотежу стимулацијом или супресијом гена који кодирају одбрамбене ензиме, структурне протеине и факторе транскрипције. Нуклеарни фактор 2 (енг. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2*) је важан транскрипциони фактор који доприноси антиоксидативној заштити и који је стога релевантан показатељ одбрамбеног потенцијала,

посебно у условима у којима СТЗ узрокује смањење нивоа ензимских и неензимских антиоксиданата у мозгу пацова.

Примена репетитивне ТМС (рТМС) као облика неинвазивне мождане стимулације може довести до дуготрајних промена у синаптичкој пластичности моторне коре. Како неуронске мреже које осцилују тета осцилацијама боље интерферирају са тета типом „прасковите“ стимулације, у студији је коришћен облик ТМС структурисан као високофреквентан „прасак“ стимулуса са тета фреквенцом (енг. *theta burst stimulation; TBS*) интермитентног обрасца (*iTBS*) који подстиче ексцитацијску неуротрансмисију. Примена *iTBS* протокола покреће неуроресторативне ефекте регулацијом експресије неуротрофних фактора који утичу на диференцијацију, преживљавање и вијабилност неурона. Бројне студије су показале да примена *iTBS* доводи до повећања садржаја неуротрофичног фактора можданог порекла (*BDNF*) у мозгу, али и да испољава утицај и на редокс стање. Способност ТМС да смањи оксидативна оштећења подстакнута је чињеницом да ТМС повећава антиоксидативни потенцијал стимулацијом антиоксидативних, односно супримирањем прооксидативних параметара. Досадашња истраживања такође потврђују потенцијал ТМС и у бихејвиоралној и когнитивној рехабилитацији.

На основу наведених података из литературе, мастер биолог Јелена Станојевић је поставила следећу **хипотезу**:

Десетодневна примена интермитентног облика стимулације тета прасковима побољшава параметре понашања (учење и памћење) и супримира активацију глија ћелија и настанак оксидативног/ нитрозативног стреса у пречеоној можданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу на пацовском моделу Алцхајмерове деменције изазване билатералном интрацеребровентрикуларном апликацијом стрептозотоцина.

Из хипотезе су јасно дефинисани **циљеви** истраживања:

1. Изазвати експериментални модел Алцхајмерове болести (АБ) код пацова билатералном интрацеребровентрикуларном апликацијом стрептозотоцина (СТЗ);
2. На моделу АБ код пацова, испитати промене понашања (учење и памћење)- меморијски учинак, радну и референтну меморију;
3. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене интермитентног облика стимулације тета прасковима (*iTBS*) на параметре понашања (учење и памћење) - меморијски учинак, радна меморија и референтна меморија;
4. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на морфологију ћелија глије у пречеоној можданој кори и хипокампусу;
5. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на прооксидативне/ пронитрозативне параметре (супероксидни анјон радикал -  $O_2^{\bullet-}$ , азот оксид -  $NO_2 + NO_3$ ), параметре оксидативног оштећења ћелијских мембрана (малондиалдехид – *MDA*) и оксидативног оштећења ДНК (8-хидрокси-2'-деоксигуанозин - *8-OHdG*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
6. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на параметре антиоксидативне заштите: активност супероксид димутаза (*tSOD*) и каталазе (*CAT*), концентрације глутатиона (*GSH*) и сулфхидрила (*SH* групе) и фактора регулације експресије антиоксидативних - протеина нуклеарног фактора 2 (*NRF2*) у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;
7. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на промене у концентрацији протеина одговора на рани фактор раста 1 (*EGFR1*) и амилоидних протеина

(амилоидни прекурсорски протеин - APP,  $\beta$  амилоид -  $A\beta_{1-42}$ ) у пречеоној мозданој кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу;

8. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на експресију неуротрофичног фактора мозданог порекла (*BDNF*) у ткиву пречеоне моздане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга;

9. На моделу АБ код пацова, утврдити утицај десетодневне примене *iTBS* на експресију мембранског транспортера за ексцитаторне аминокиселине 2 (*EAAT2*) у ткиву пречеоне моздане коре и хипокампуса.

У поглављу **Материјал и методе** кандидат јасно, прецизно и детаљно представља дизајн експерименталне студије. Истраживање је спроведено као експериментална студија на животињама *in vivo*. Комплетно истраживање је урађено на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Током рада са животињама поштовани су етички принципи рада на лабораторијским животињама Војномедицинске академије у Београду, као и Закон о заштити животиња („Службени гласник РС“, број 41/09), који су у складу са правилима Директиве европског парламента о заштити животиња коришћених за научне сврхе 2010/63/EУ од 22.09.2010. године. Експеримент је одобрен од стране Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управе за ветерину (број 323-07-08358/2020-05).

Студијски узорак је израчунат помоћу комерцијално доступног програма *GPower 3.1.*, за вероватноћу грешке типа I ( $\alpha = 0,05$ ) и снагу студије  $>80\%$ . Узимајући у обзир дизајн студије, значајност разлике унутар и између група, уз нормалну расподелу праћених параметара, утврђена је применом различитих модалитета анализе варијансе. Уз очекивану високу разлику вредности између пет експерименталних група (јачина ефекта 0,4), број јединки у свакој појединачној групи је био 13.

Добијене вредности су презентоване као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности су коришћени тестови: једносмерна анализа варијансе (ANOVA) са поновљеним мерењима и независни Студентов *t* тест за обележја са нормалном расподелом, као и *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови за непараметарска обележја. За тестирање зависности између појединих варијабли коришћен је тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање *Pearson*-овог коефицијента корелације. Статистичка обрада добијених резултата вршена је помоћу комерцијалног програмског пакета *GraphPad Prism 9.00*. Статистичка значајност је одређена на  $p < 0,05$ .

У поглављу **Резултати**, кроз 25 слика и графикана детаљно су приказани резултати бихејвиоралних промена- теста ротирајућег цилиндра и тестова у зракастом лавиринту, као и структурних промена- хистохемијске анализе мозданих пресека и имунохистохемијске експримираности јонизујућег калцијум-везујућег адапторног молекула (*Iba1*), глијалног фибриларног киселог протеина (*GFAP*), виментина и транспортера ексцитаторних аминокиселина 2. Резултати функционалних промена у мозданим структурама приказани су кроз производњу супероксидног анјона, садржај нитрата и нитрита, садржај тиобарбитурна киселина (ТВА)-реагујућих супстанци, концентрацију 8-хидрокси-2'-деоксигуанозина, активност укупне супероксид дисмутазе, активност каталазе, садржај сулфхидрилних група, концентрацију укупног глутатиона, активност *NRF2*, концентрацију амилоидног прекурсорског протеина, концентрацију  $\beta$  амилоида, *EGRI* и *BDNF*.

**Дискусија** је написана јасно и прегледно уз упоредни приказ познатих података из релевантних публикованих радова и добијених резултата из докторске дисертације.

**Закључци** сажето приказују најважнија сазнања која су проистекла из добијених резултата.

У литератури је наведено 329 референци које су цитиране у тексту дисертације.

## **Б) Кратак опис постигнутих резултата**

Резултати докторске дисертације, у складу са постављеним циљевима истраживања, довели су до сазнања о томе да:

1. Интрацеребровентрикуларна (ицв) апликација СТЗ (једнократно, 3 mg/kg) 30 дана након примене не доводи до промена моторне координације и равнотеже код *Wistar* пацова;
2. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ оштећује параметре понашања (учење и памћење; меморијски учинак, радну и референтну меморију), док десетодневна примена *iTBS* побољшава поменуте параметре код *Wistar* пацова;
3. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до благих морфолошких промена неурона у региону *CA3* вентралног хипокампуса, перивентрикуларној области, каудопутамену и медијалној хабенули *Wistar* пацова;
4. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећане имунореактивности *Iba+* ћелија, док десетодневна примена *iTBS* смањује микроглиозу у *gyrus dentatus*, фимбрији, *CA1* региону дорзалног хипокампуса, медијалној хабенули, пречеоној можданој кори и каудопутамену *Wistar* пацова;
5. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ узрокује благо до умерено повећање имунореактивности *GFAP+ / VIM+* ћелија, док десетодневна примена *iTBS* смањује астроглиозу у хипокампусу, фимбрији и перивентрикуларној области каудопутамена *Wistar* пацова;
6. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећаног стварања прооксидативних и пронитрозативних параметара, док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова;
7. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећања оксидативног оштећења ћелијских мембрана и оксидативног оштећења ДНК, док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума и малог мозга *Wistar* пацова;
8. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до смањења параметара антиоксидативне заштите као и *NRF2*, док десетодневна примена *iTBS* повећава поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова;
9. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до повећања концентрације *EGR1* и амилоидних протеина, док десетодневна примена *iTBS* смањује поменуте параметре у ткиву пречеоне мождане коре и стријатума *Wistar* пацова;
10. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ доводи до смањења експресије *BDNF*, док десетодневна примена *iTBS* повећава овај секреторни протеин у ткиву пречеоне мождане коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга *Wistar* пацова;.

11. Интрацеребровентрикуларна апликација СТЗ нема утицај на експресију мембранског транспортера за ексцитаторне аминокиселине 2 (*EAAT2*), као ни десетодневна примена *iTBS* у ткиву преоне мождане коре и хипокампуса *Wistar* пацова.

## **В) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе**

У поглављу Дискусија докторанд садржајно и критички сагледава резултате у складу са постојећим сазнањима добијеним анализом података из литературе из области примене ТМС на експерименталном моделу хумане АБ изазване интрацеребралном апликацијом стрептозотоцина код *Wistar* пацова. Начин писања дискусије и примењени аргументи, јасно показују да мастер биолог Јелена Станојевић у потпуности влада проблематиком области којом се бави тема докторске дисертације.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације доприносе детаљнијем сагледавању молекулских механизма потенцијалног терапијског деловања десетодневне примене *iTBS* након давања стрептозотоцина. Праћењем бихејвиоралних параметара добио се прецизан увид у процену оштећења когнитивних функција животиња, док је степен активације глија ћелија указао на морфолошко и функционално ремоделирање покренуто поновљеном применом *iTBS* на овом експерименталном моделу. Такође, резултати спроведене студије пружају прецизније податке о редокс стању и степену метаболичких промена у селективно осетљивим структурама мозга са крајњим циљем увођења *iTBS* протокола у комбиновану терапију са фармаколошким средствима, чиме би се побољшала перспектива лечења различитих поремећаја нервног система код људи.

## **Г) Објављени радови из ове докторске тезе**

1. Stanojevic J, Dragic M, Stevanovic I, Ilic T, Stojanovic I, Zeljkovic M, Ninkovic M. Intermittent theta burst stimulation ameliorates cognitive impairment and hippocampal gliosis in the Streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease. *Behavioral Brain Research* 2022; 433:113984 (M22; IF=3.352) - (рад објављен пре одлуке Сената УО);

2. Stanojevic J, Zeljkovic M, Dragic M, Stojanovic I, Ilic T, Stevanovic I, Ninkovic M. Intermittent theta burst stimulation attenuates oxidative stress and reactive astrogliosis in the Streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease-like pathology. *Front Aging Neurosci* 2023. (M21; IF=5,702) - (рад публикован након одлуке Сената УО).

## **Д) Закључак и предлог**

Кандидат мастер биолог Јелена Станојевић испуњава све услове дефинисане Чланом 7. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука ("Службени војни лист", бр. 20/12; 25/13 и 12/16), што обухвата написану докторску дисертацију и публикована два рада у часописима категорије М21 (IF=5,702) и М22 (IF=3.352) у оквиру докторске тезе у којима је кандидат први аутор.

Докторска дисертација под називом "**Модулацијски ефекат интермитентног облика стимулације тета прасковима на оксидативно стање и активацију глије у селективно осетљивим можданим структурама на моделу стрептозотоцином изазване Алцхајмерове деменције**" представља оригиналан и актуелан научни рад из области неуронаука.

Истраживање је спроведено са свим начелима етичког приступа и научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито.

Добијени резултати представљају значајан допринос фундаменталним сазнањима о функционалним субцелуларним променама након примене *iTBS* протокола на моделу хумане АБ са СТЗ, са аспекта праћења бихејвиоралних параметара, степена активације глија ћелија, као и оксидативног стања и степена метаболичких промена у селективно осетљивим структурама мозга.

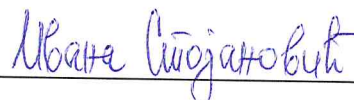
На основу изнетог, а имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, Комисија закључује да докторска дисертација мастер биолога Јелене Станојевић испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква представља значајан допринос проучавању у датој области. Будући да кандидаткиња испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске дисертације, Комисија предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду да овај рад прихвати као завршену докторску дисертацију мастер биолога Јелене Станојевић и омогући његову јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 13.11.2023.

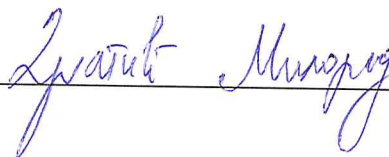
проф. др Милица Нинковић, председник



проф. др Ивана Стојановић, члан



научни сарадник др Милорад Драгић, члан



14 NOV 2023



РЕПУБЛИКА СРБИЈА  
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ  
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ  
Медицински факултет ВМА

Бр. 5443-1

БЕОГРАД 20.