

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 16.06. 2015. godine, broj 4600/15 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj aluminijuma na strukturne i biohemijske karakteristike mozga pustinjskih miševa”**

kandidata mr dr Svetlane Vu eti -Arsi , zaposlene u Specijalnoj bolnici za bolesti zavisnosti u Beogradu, kao lekar specijalista neurologije i subspecijalista za bolesti zavisnosti. Mentor je Prof. dr Nataša Petronijevi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr Ivanka Markovi , vanredni profesor, Instituta za medicinsku i klini ku biohemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Elka Stefanova, vanredni profesor, Klinike za neurologiju KCS, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof dr Vesna Selakovi -Mi unovi , redovni profesor, Medicinskog fakulteta, Vojno Medicinske Akademije u Beogradu.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Svetlane Vu eti -Arsi napisana je na 119 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 13 grafikona, 2 tabele i 5 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** je definisan zna aj i uloga aluminijuma (Al), kao veoma estog i rasprostranjenog elementa u ovekovom okruženju. Istaknuta je široka primena ovog metala, njegova dostupnost i upotrebna vrednost u ljudskom društvu, ali i dosadašnja saznanja o štetnim efektima po zdravlje. Istaknuti su na ini humane ekspozicije jedinjenjima Al, njegova bioraspoloživost kao neesencijalnog elementa i osobito mehanizmi toksi nosti po ovekov organizam. Navedeni su dosadašnji rezultati istraživanja o neurotoksi nosti Al i efektima na centralni nervni sistem (CNS) i opisani patofiziološki procesi sa posebnim osvrtom na oksidativni stres, celularne mehanizme ošte enja i disfunkciju mitohondrija.

Prikazana su aktuelna saznanja o etiopategenzi Alchajmerove bolesti (AB), kao naj eš eg neurodegenerativnog oboljenja starijeg doba, u humanojoj populaciji. Opisana je udruženost AB i neurotoksi nost Al kao i pretpostavljeni mehanizmi nastanka ošte enja kroz pregled savremenih epidemioloških, klini kih, eksperimentalnih i neuroimidžing studija. Opisan je zna aj oksidativnog stresa u Al indukovanoj neurotoksi nosti kao i uloga enzimskih sistema koji su involvirani u procese ošte enja mitohondrijalnog metabolizma, elektronskog disbalansa i kupiranja slobodnih kiseonih radikala (ROS). Istaknuta je uloga kompleksnog enzimskog sistema - nikotinamid adenozn dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH oksidaze - NOX) u fiziološkim uslovima kao i zna aj poja ane ekspresije ovog enzima u patološkim stanjima i iniciranju oksidativnog stresa u mikroglialnim i neuronskim elijama. Predo en je mehanizam NOX<sub>2</sub>, kao transmembranskog elektrotransportera, koji ima kapacitet da generiše kiseonih radikale i potencijalno aktivira procese oksidativnog stresa u razli itim oboljenjima. Detaljno je prikazan uticaj i povezanosti amiloida, kao proinflamatornog

okida a, u aktivaciji mikroglije koja indukuje povećanu ekspresiju NOX<sub>2</sub> enzima kako u mikrogliji tako i u neuronima direktno obolelih od AB.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju uticaja aluminijuma, na specifične moždane strukture akutno i subakutno peroralno tretiranih pustinjskih miševa (*Meriones Unguiculatus*; eng. *Mongolian gerbils*). Ciljevi doktorske teze bili su da se ispita dinamika promena: (a) holinergičkog sistema (aktivnost acetiholinesteraze), (b) mitohondrijalnog mehanizma kroz pokazatelje oksidativnog stresa (koncentracija superoksid anjona, sadržaj lipidnih peroksida, koncentracija sulfhidrilnih grupa, aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze) i (c) enzima respiratornog lanca (aktivnost citohrom *c* oksidaze i kompleksa I) u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u životinja u toku prvih 24 sata nakon akutnog tretmana različitim dozama (LD<sub>25</sub> i LD<sub>50</sub>) aluminijuma hlorida (AlCl<sub>3</sub> x6H<sub>2</sub>O).

Takodje, cilj je bio i da se odredi aktivnost citohrom *c* oksidaze, aktivnost acetiholinesteraze i pokazatelje oksidativnog stresa (sadržaj lipidnih peroksida, aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze) u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u džerbila nakon subakutnog tretmana sa AlCl<sub>3</sub> koji je aplikovan gavažom u dozi LD<sub>10</sub> u toku tri nedelje. I na posletku, da se ustanovi uticaj subakutnog davanja AlCl<sub>3</sub> (LD<sub>10</sub>) na ekspresiju amiloida, NADPH oksidaze (NOX), pojedinih izoenzima superoksid dizmutaze (SOD<sub>1</sub> i SOD<sub>2</sub>) u mozgu pustinjskih miševa, tehnikama imunohistohemije i *Western blota*.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti rađeni na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta u Beogradu i sprovodene u skladu sa etičkim principima i smernicama za brigu o životinjama. Opisan je eksperimentalni model akutnog tretmana džerbila gavažom AlCl<sub>3</sub> u dve doze od LD<sub>25</sub> i LD<sub>50</sub> i subakutni tretman dozom od LD<sub>10</sub>. Precizno su navedeni način ekstrakcije moždanog tkiva i izolovanje moždanih struktura: korteksa, hipokampusu, talamusa i *nc. caudatus*-a za biohemijske analize. Pojedinačno su navedene procedure i tehnike određivanja aktivnosti ispitivanih enzima u sinaptosomalnoj frakciji. Detaljno je opisana metodologija određivanja ekspresije proteina tehnikom *Western blota* u džerbila

tretiranih Al u trajanju od 21 dan. Ovom tehnikom je obuhvaćeno određivanje ekspresije amiloida, enzima NADPH oksidaze, kao i enzima SOD<sub>1</sub> i SOD<sub>2</sub>. Opisana je priprema uzoraka za imunohistohemiju (kriopreseki) i imunohistohemija amiloida subakutno tretiranih životinja. Za vizuelizaciju je korišten *En Vision Dual Link System-HRP (DAKO)* koji sadrži sekundarna antitela. Obojeni iseci su analizirani svetlosnom mikroskopijom uz pomoć softvera *ImageJ*.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korištena **literatura** sadrži spisak od 263 referenci.

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

Ovo istraživanje je pokazalo da nakon akutne administracije aluminijum hloridom dolazi do neposrednih promena u dinamici aktivnosti ispitivanih enzimskih sistema u koreksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u eksperimentalnih životinja nakon per os administracije unutar prvih 24 sata.

Zapažene su promene u aktivnosti enzima acetilholin esteraze (AChE) u ispitivanim strukturama, koja je statistički značajno niža u komparaciji sa kontrolnom grupom i tokom celokupnog perioda praćenja promena enzimska aktivnost nije zavisila od administrirane doze Al. Nadalje, rezultati su pokazali da aktivnost ukupne SOD pokazuje signifikantni porast u svim moždanim strukturama tokom 24 h, dok promene u produkciji superoksid anjona (O<sup>2-</sup>) korespondiraju sa promenama u aktivnosti ukupne SOD. Porast produkcije superanijona primetan nakon prvih 2h, održava se nakon 6h i registruje pad na normalne vrednosti 24 sata po tretmanu.

Nakon akutne administracije Al aktivnost antioksidativnog enzima katalaze (CAT), pokazuje značajne, strukturno specifične promene u aktivnosti u svim ispitivanim moždanim strukturama u toku prvih 24 sata. Dinamika promena u mitohondrijalnom elektronskom transportnom lancu nakon 24 sata od akutnog tretmana Al predstavljena je kroz praćenje

aktivnosti enzima citohrom *c* oksidaze (COX) enzima i Kompleksa I. COX aktivnost je pokazala izvesnu dozu i strukturnu specifičnost, dok promene u aktivnosti Kompleksa I respiratornog lanca nisu zapažene. Akutna administracija Al pokazala je signifikantno značajan porast nivoa lipidnih peroksida (MDA) u poredjenju sa kontrolama, u obe ispitivane doze, u svim ispitivanim moždanim strukturama u toku prvih 24 sata po tretmanu. Step en oksidacije proteina, opserviran je kroz vrednosti nivoa sulfhidrilnih grupa (SH grupa), koji u svim moždanim strukturama nakon dva sata po administraciji Al beleži pad u odnosu na kontrolne vrednosti i to u obe aplikovane doze i ima sličnu tendencu tokom narednih 24 sata.

Rezultati nakon subakutnog trovanja aluminijum hloridom uzrokuju pad AChE aktivnosti u svim ispitivanim moždanim strukturama, statistički značajan porast SOD aktivnosti kao i porast nivoa superoksidnih anjona ( $O_2^-$ ) u ispitivanim strukturama. Nadalje, subakutno trovanje u dozi od  $LD_{10}$  izaziva statistički značajan pad COX aktivnosti kao i CAT aktivnosti u svim ispitivanim moždanim strukturama, sem hipokampusu.

Rezultati dobijeni *Western blotom* pokazali su da postoji subjedinina i strukturna specifičnost u ekspresiji NDPH oksidaze nakon subakutnog trovanja eksperimentalnih životinja sa  $AlCl_3$ . Takođe, iz rezultata proizilazi da citosolna  $SOD_1$  pokazuje statistički značajno povišenu ekspresiju u kortikalnim strukturama, a mitohondrijalna  $SOD_2$  u hipokampalnim strukturama u poredjenju sa kontrolama.

Imunohistohemijska određivanje ekspresije ukupnog amiloida u kortikalnim i hipokampalnim neuronima subakutno tretiranih životinja dovodi do povećanog formiranja agregata amiloidnog proteina u korteksu i hipokampusu mongolskih džerbila.

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

Istraživanju ove doktorske disertacije i njeni rezultati ukazuju da je u periodu od 24 sata po administraciji Al, aktivnost enzima AChE u ispitivanim strukturama globalno snižena u komparaciji sa kontrolnom grupom i tokom celokupnog perioda praćenja promena enzimska aktivnost nije zavisila od administrirane doze Al. U saglasju sa navednim rezultatima su i rezultati istraživanja u kom je dokazan signifikantan pad AChE aktivnosti u korteksu i strijatumu Wistar pacova nakon intrahipokampalnog tretmana  $AlCl_3$  (Stevanović et al., 2010).

Na dalje, sli ni rezultati dobijeni su u studiji Kajzera i saradnika (Kaizer i sar., 2008) kojom je dokazano, nakon dugotrajne ekspozicije miševa tretiranih gavažom  $AlCl_3$ , zna ajn pad aktivnosti AChE u homogenatu cerebeluma, hipokampusu i cerebralnog korteksa.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali porast aktivnosti SOD verifikovan u svim ispitivanim moždanim strukturama nakon akutnog trovanja i po subakutnom trovanju aluminijumom. Navedeni rezultati koreliraju sa istraživanjem Resendea i sar. (2008) koji su u svoj studiji objavili zna ajan porast aktivnosti SOD i glutacion peroksidaze (GPx) kao i vrednosti lipidnih peroksida u mozgu trostruko-transgenih miševa koriš enih kao model za AB.

Istraživanja Murakamija i Takahikoa (2012) pokazala su uticaj  $SOD_1$  u progresiji AB. Superoksidni radikali u citoplazmi indukovali su oligomerizaciju A i rani kognitivni deficit u transgenih miševa Tg2576. Ova istraživanja su u saglasju sa dobijenim rezultatima ove doktorske disertacije koji pokazuju porast  $SOD_1$  ekspresije u kortikalnim strukturama džerbila tretiranih tokom subakutnog trovanja 21 dan.

Ovo istraživanje registrovalo je porast nivoa lipidnih peroksida ubrzo, ve dva asa nakon akutne ingestije Al (i to u obe doze  $LD_{25}$  i  $LD_{50}$ ) kao rani signal nastalog oksidativnog stresa u ispitivanim moždanim strukturama. Ovi rezultati koreliraju sa potenciranom lipidnom peroksidacijom opisanom *in vivo* u moždanom tkivu i telesnim te nostima obolelih od AB (Keller i sar., 2005) i u *in vitro* studijama (Verstraeten i sar., 2008). Takodje, naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima studije u kojima je prikazana strukturna specifi nost i alteracija pojedinih antioksidativnih enzima određivanih u mozgu mladunaca pacova tretiranih 14 dana  $AlCl_3$  u dozi od  $LD_{50}$ , u hipokampusu, diencefalonu i cerebelumu. U navednim strukturama opisana je statisti ki zna ajan porast vrednosti aluminijuma i lipidnih peroksida u poredjenu sa kontrolama (Yuan i sar., 2012).

Prethodno objavljena eksperimentalna istraživanja, na Wistar pacovima, su potvrdila pad aktivnosti COX nakon trodnevnog interhipokampalnog tretmana  $AlCl_3$  u ispitivanim moždanim strukturama: korteksu hipokampusu i basal forbrain-u (Stevnovi i sar., 2013). Naša istraživanja koreliraju sa prethodnim i pokazala su da nakon subakutnog tretmana Al se beleži pad aktivnosti enzima COX u svim ispitivanim moždanim strukturama.

Aktulena istraživanja potenciraju ulogu NADPH oxidase (NOX) u generisanju reaktivnih kiseoni nih radikala, tzv. slobodnih kiseoni nih radikala (eng.reactive oxygen species) (ROS) (Sorice i Krause, 2009). Naši rezultati pokazuju da nakon subakutnog tretmana Al u kortikalnim strukturama dolazi do pove anja aktivnosti membranskih subjedinica NOX<sub>2</sub> - p22<sup>phox</sup> i gp91<sup>phox</sup>.

Naša imunohistohemijska istraživanja ekspesije amiloda u kortikalnim i hipokampalnim neuronima subakutno tretiranih životinja pokazala su da postoji statistički zna ajana razlika u poredjenju sa kontrolama. Sa našim rezultatima su u saglasnosti zaključci nedavnog istraživanja Savage i sar. (2014) u kom je dokazano da nivoi oligomera ne moraju biti udruženi sa staroš u (ilipolom), ali da zato postoji inverzna korelacija njihovog sdržaja sa skorom na Mini mental testu (MMS) ispitanika.

#### **D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije**

1. **Vu eti -Arsi S**, Radonji NV, Jovanovi M, Selakovi V, Nikoli T, Velimirovi M, Stojkovi T, Milovanovi A, Milovanovi J and Petronijevi ND. Oxidative stress precedes mitochondrial dysfunction in gerbil brain after aluminum ingestion. *Envir toxic and pharm* 2013;36: 1242–1252.

#### **E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Uticaj aluminijuma na strukturne i biohemijske karakteristike mozga pustinjskih miševa**” dr Svetlane Vu eti -Arsi predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju mehanizama koji u estvuju u patogenezi oksidativnog stresa indukovano toksonim dejstvom aluminijuma. Ovim istraživanjem rasvetljeni su izvesni aspekti neurotoksnosti aluminijuma i njegova kauzalna povezanost sa patofiziološkim promenama u CNS-a na eksperimentalnom modelu. Navedeni rezultati ove doktorske teze potkrepljuju pretpostavku da se oksidativni stres kao i promene u aktivnosti enzima u holinergičkim sinapsama, javlja rano po ingestiji Al. Dokazan je disbalans mitohondrijalnog metabolizma kroz promene aktivnosti pojedina nih enzimskih sistema i porast aktivnosti antioksidantnih enzima. Potencijalna toksnost ovog metala u oena je i kroz porast ekspresije subjedinica NADPH oksidaze po subakutnom tretmanu AlCl<sub>3</sub>. Rezultati ove doktorske

disertacije bi mogli da pomognu u razumevanju ranog patofiziološkog substrata aluminijumom indukovane neurotoksnošći kao i da ukažu na moguće strategije u prevenciji i tretmanu Alchajmerove bolesti.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Svetlane Vučetić-Arsić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.06. 2015.

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivanka Marković

---

Prof. dr Elka Stefanova

---

Prof. dr Vesna Selaković - Mićunović

---

Mentor:

Prof. dr Nataša Petronijević

---



