

## NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu od 24.12.2015. godine za ocenu doktorske disertacije pod nazivom „Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u modelu multiple skleroze kod pacova“, kandidata Marjana Popovi a, odre ena je komisija u sastavu:

1. prof. dr Vera Pravica - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. prof. dr Dušan Popadi - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. prof. dr Silvana Andri - Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matemati ki fakultet Univerziteta u Novom Sadu
4. VNS. dr Miljana Mom ilovi - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stankovi “ u Beogradu
5. N.sar.dr Verica Paunovi - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Vladimir Trajkovi , a komentor prof. dr Aleksandra Isakovi .

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi komisije Nau nom ve u Medicinskog fakulteta u Beogradu jednoglasno podnose slede i

## IZVEŠTAJ

### A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija „Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u modelu multiple skleroze kod pacova“ sadrži sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i Metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. Disertacija je napisana na 100 strana, sadrži 19 slika, 4 tabele i 1 šemu. U posljednjem poglavlju je pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 250 navoda.

**UVOD** je izložen na 20 strana, i sastoji se iz 3 odeljka. U prvom odeljku, koji je podjeljen u 8 celina, kandidat daje podatke o etiologiji Multiple skleroze (MS) predstavljaju i nekoliko teorija kojima se objašnjava nastanak ove bolesti kao što su: autoimunska, infektivna (virusna), i neurodegenerativna teorija. Druga celina se bavi epidemiologijom bolesti. U trećoj i četvrtoj celini kandidat objašnjava uticaj sredinskih faktora (infektivni agensi, izloženost sunčevoj svetlosti i ultraljubičastom zračenju, nedostatak vitamina D, pušenje i gojaznost) i genskih faktora (geni glavnog kompleksa histokompatibilnosti, kao i uticaj mutacija i polimorfizama drugih gena sa malim efektom koji zbirno doprinose osetljivosti na nastanak bolesti). U petoj celini predstavljene su kliničke forme MS-a, kao heterogene bolesti kako u pogledu histopatologije tako i u odnosu na njihove kliničke manifestacije, navode i osnovne odlike četiri tipa bolesti: relapsno-remitentnog, primarno-progresivnog, sekundarno-progresivnog i progresivno-relapsnog tipa. U narednoj celini kandidat predstavlja savremena saznanja o osnovnoj patohistološkoj odlici bolesti - demijelinizacionim žarištima/plakama, njihovom hemijskom sastavu i rasprostranjenosti u centralnom nervnom sistemu, kao i o kliničkim posledicama patološke demijelinizacije aksona. U sedmoj celini kandidat se posebno osvrće na složenost hemijskih i molekularnih mehanizama uključujući u imunopatogenezu MS-a, objašnjavaju i doprinos  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T ćelija specifičnih za mijelin, kao i doprinos B-ćelija i autoantitela u nastanku inflamacije nervnog sistema; dalje ističe raznovrsnost autoantigena, kao i ulogu brojnih solubilnih medijatora neuroinflamacije kao što su citokini. U poslednjoj celini prvog odeljka kandidat predstavlja osnovne terapeutike i mehanizme njihovog dejstva u savremenom lečenju pacijenata. S obzirom da najveći deo saznanja koja danas posedujemo o MS-u potiču od animalnih modela ove bolesti, u drugom odeljku koji je podjeljen u 4 celine, kandidat predstavlja prednosti animalnih modela u proučavanju ove bolesti, sa posebnim osvrtom na eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), ističe odlike i puteve indukcije objašnjava u drugoj celini ovog odeljka. U

narednoj celini kandidat daje podatke o imunopatogenezi EAE-a, ulozi encefalitogenih T- elija i njihovih najvažnijih efektorskih molekula – citokina, kao i doprinosu B limfocita u nastanku EAE-a. U poslednjoj celini drugog odeljka kandidat diskutuje primenljivost EAE-a kao modela u izu avanju MS-a, kao i njegova glavna ograni enja. U nastavku uvoda, u tre em odeljku, kandidat predstavlja osnovne podatke o arilpiperazinskim dopaminergi kim ligandima, iji efekat na model EAE predstavlja temu ove teze. Iako je u prethodnim *in vitro* studijama pokazano da arilpiperazinski dopaminergi ki ligandi ostvaruju antiinflamatorno i neuroprotektivno dejstvo u razli itim eksperimentalnim sistemima, do sada nije ispitivan njihov efekat u *in vivo* modelu autoimunske bolesti, kakav je EAE, iz ega proizilazi i **radna hipoteza** da bi arilpiperazinski dopaminergi ki ligandi mogli imati protektivno dejstvo i u modelu MS-a.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su jasno definisani: ispitivanje efekata arilpiperazinskih dopaminergi kih liganada na klini ki tok bolesti i inflamaciju CNS-a u modelu EAE-a, kao i ispitivanje celularnih i molekularnih mehanizama anti-inflamatornog dejstva arilpiperazina u EAE-u.

**MATERIJAL i METODE** su jasno i pregledno izloženi na 16 strana u jedanaest odeljaka i sadrže 3 tabele. U prvom odeljku navedene su karakteristike eksperimentalnih životinja koriš enih u istraživanju. Zatim je, u drugom odeljku, naveden na in indukcije EAE-a, kao i na in procene klini kih znakova bolesti. U tre em odeljku ovog segmenta teze, kandidat opisuje tretman eksperimentalnih životinja arilpiperazinskim ligandima 6a i 6b. etvrti odeljak se odnosi na opis pripreme elijskih suspenzija i kultivisanja elija, gde se daje opis medijuma za pripremu i kultivisanje elija; na in izolovanja i odre ivanja broja elija limfnog vora, kao i na in izolovanja monunuklearnih elija ki mene moždine. Peti odeljak ovog segmenta teze pruža detaljan uvid u metodu proto ne citofluorimetrije i izlaže ukratko protokole primenjene za specifi na bojenja, u cilju detekcije membranskih molekula, kao i unutar elijskih citokina. U šestom odeljku kandidat opisuje odre ivanje nivoa ekspresije gena, po evši od protokola za izolaciju RNK, preko reverzne transkripcije u cDNK, da bi se upotrebom navedenih specifi nih prajmera i proba odredio relativni nivo ekspresije gena proinflamatornih i anti-inflamatornih citokina i medijatora, kao i transkripcionih faktora upotrebom metode kvantitativnog *real time* PCR-a (*qRT-PCR*). Opis tehnike imunoblota, sa ciljem ispitivanja nivoa aktivacije unutar elijskih kinaza Src, Akt, AMPK, p70S6K, kao i PARP polimeraze izložen je u sedmom odeljku. U ovom odeljku je opisan i na in kvantifikacije aktivnosti specifi nih proteina primenom denzitometrijske analize koriš enjem kompjuterskog programa ImageJ. U narednom odeljku opisana je histološka analiza

uzoraka ki mene moždine pacova obojenih hematoksilin-eozinom (HE), pri emu je morfometrijska analiza oblasti sa infiltratom mononuklearnih elija izvedena koriš enjem Fiji (ImageJ) softvera. U devetom odeljku ovog segmenta teze dat je opis na ina detekcije apoptotskih elija sa fragmentiranom jedarnom DNK (TUNEL esej) u tkivu CNS-a. Deseti odeljak opisuje protokol za in vitro kokultivaciju oligodendrocitne elijske linije pacova (OLN93) i elijske linije feohromocitoma pacova (PC12) sa limfocitima neimunizovanih ili imunizovanih pacova stimulisanih mitogenom, odnosno antigenom. Potom kandidat opisuje kolorimetrijsko odre ivanja elijskog vijabiliteta OLN93 i PC12 elija upotrebom MTT metode. Jedanaesti odeljak ovog segmenta teze daje prikaz statisti kih metoda koriš enih u analizi podataka. Za pore enje rezultata dobijenih za nezavisne uzorke koriš en je parametarski – Studentov t-test ili jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), pra ena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka pore enja. Vrednosti  $p < 0,05$  smatrane su statisti ki zna ajnim.

**REZULTATI** su predstavljeni na 26 strana, u 7 odeljaka i sadrže 19 slika i jednu tabelu, kao i propratna objašnjenja koja se odnose na podatke prikazane na slikama i tabeli.

U prvom odeljku ovog poglavlja teze prikazan je uticaj kontinuiranog tretmana arilpiperazinima na klini ke znake EAE-a. Prikazani su rezultati ispitivanja akutne toksi nosti i mogu e interferencije sa klini kim znacima EAE-a u tretmanu arilpiperazinima 6a i 6b, kao i njihov uticaj na klini ke znake i promenu telesne mase u kontinuiranom tretmanu arilpiperazinima u EAE-u.

Zatim su, u drugom odeljku, izloženi rezultati ispitivanja uticaja arilpiperazina na klini ke znake EAE-a tokom selektivnog tretmana samo u induktivnoj ili efektorskoj fazi bolesti. Tre i odeljak se odnosi na ispitivanje uticaja arilpiperazina na infiltraciju imunskih elija u centralni nervni sistem tokom EAE-a, kao i na brojnost mononuklearnih elija u dreniraju im limfnim vorovima. U cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizma neurotoprotektivnog delovanja arilpiperazina *in vivo*, u narednom odeljku predstavljeni su rezultati ispitivanja njihovog uticaja na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore: IL-12, IL-6, IL-23, ROR $\gamma$ t, TGF- $\beta$ , TNF, GM-CSF, IL-17, IL-1Ra, IFN $\gamma$ , IL-10, Foxp3, T-bet i IL-1 $\beta$  u tkivu centralnog nervnog sistema, kao i u mononuklearnim elijama infiltriranim u centralni nervni sistem tokom EAE-a. Peti odeljak se odnosi na rezultate istraživanja uticaja arilpiperazina na zastupljenost razli itih elijskih populacija, i njihove produkcije citokina, kao što su CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD11b/c+, CD4+IFN $\gamma$ +, CD4+IL10+, CD4+IL17+, CD8+IFN $\gamma$ + i CD8+IL10+ elije u infiltratu mononuklearnih elija tokom EAE-a. Šesti odeljak se odnosi na dalje ispitivanje mehanizama pokazanog

protektivnog dejstva arilpiperazina *in vivo*, s im u vezi su prikazani rezultati istraživanja uticaja arilpiperazina na apoptozu u ki menož moždini pacova sa EAE-om, kao i njihov uticaj na aktivnost Akt/mTOR signalnog puta, posebno obra aju i pažnju na aktivnost kinaza Src, Akt, AMPK, mTOR, p70S6k, kao i aktivnost apoptotskog markera PARP u homogenatu ki mene moždine bolesnih pacova.

U poslednjem, sedmom odeljku, prikazani su rezultati koji ukazuju na protektivnu ulogu arilpiperazina *in vitro*, gde je predstavljena analiza uticaja arilpiperazina na vijabilitet elijskih linija OLN93 i PC12, kokultivisanih sa mitogenom-stimulisanim mononuklearnim elijama normalnog limfnog vora, odnosno sa antigenom (MBP) stimulisanim mononuklearnim elijama dreniraju eg limfnog vora pacova sa EAE-om. U cilju boljeg razumevanja molekularnog mehanizma dejstva arilpiperazina poseban segment se odnosi na analizu njihovog uticaja na ekspresiju gena za inflamatorne medijatore/regulatore IL-12, IL-6, IL-23, ROR $\gamma$ t, TGF- $\beta$ , TNF, GM-CSF, IL-17, IL-1Ra, IFN $\gamma$ , IL-10, Foxp3, T-bet i IL-1 $\beta$  u nespecifi no i specifi no stimulisanim mononuklearnim elijama limfnog vora *in vitro*.

Svaki rezultat je analiziran na odgovaraju i na in, i na osnovu njega je izveden jasan i logi an zaklju ak.

U poglavlju **DISKUSIJA**, koje je izloženo na 11 strana, rezultati istraživanja su razmatrani na sveobuhvatan na in i tuma eni u skladu sa podacima iz literature. Prvi deo diskusije se odnosi na ispitivanje delovanja arilpiperazinskih dopaminergih ligandana u razli itim fazama EAE-a, da bi u nastavku bio razmatran elijski i molekularni mehanizam neuroprotektivnog delovanja arilpiperazina. Analizom rezultata pokazano je zna ajno smanjenje broja elija infiltriranih u centralni nervni sistem bez uticaja na ekspresiju najzna ajnijih transkripcionih faktora i citokina koji su uklju eni u inflamaciju CNS-a, zatim odsustvo uticaja na promenu elijskog sastava inflamatornih infiltrata, smanjenje apoptoze elija centralnog nervnog sistema, kao i *in vitro* spašavanje oligodendrocitnih i neuronskih elijskih linija, što je diskutovano u kontekstu poznatih podataka iz literature. Kao jedan od mogućih mehanizama koji dovodi do neuroprotekcije razmatrano je pove anje aktivnosti Akt/mTOR signalnog puta, iji zna aj u preživljavanju elija je dobro poznat iz prethodno objavljenih studija.

U poglavlju **ZAKLJU AK** kandidat je iz svojih rezultata izveo jasne i nedvosmislene zaklju ke, koji su u potpunosti odgovorili na postavljene ciljeve istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 250 referenci po abecednom redu, koje su u disertaciji citirane harvardskim stilom.

## B. Opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja su najpre pokazali da ispitivani derivati arilpiperazina 6a i 6b ne ispoljavaju toksi nost ni efekte koji bi mogli da interferiraju sa klini kim znacima EAE-a. Pokazano je da oba tretmana zna ajno snižavaju klini ke manifestacije EAE-a u više vremenskih ta aka, pri emu je derivat 6b imao izraženije protektivno dejstvo. Dodatne analize su pokazale da je po etak bolesti bio odložen, a zbirna klini ka ocena zna ajno niža u grupi životinja tretiranih arilpiperazinima. Zbog bolje efikasnosti derivat 6b je uglavnom koriš en u narednim eksperimentima. Analiza promene telesne mase životinja je pokazala da tretman arilpiperazinima spre ava gubitak telesne mase, što je dodatno potvrdilo njihovo protektivno dejstvo. Da bi se detaljnije ispitala faza bolesti u kojoj ispitivani derivati ispoljavaju zaštitini efekat izveden je niz eksperimenata koji su pokazali da za razliku od kontinuiranog tretmana nikakav zaštitni efekat nije prime en kod pacova tretiranih arilpiperazinima tokom induktivne faze EAE-a. Suprotno tome, kada su eksperimentalne životinje tretirane tokom efektorske faze bolesti prime ena je mnogo blaža forma EAE-a, što se manifestovalo zna ajno nižim ocenama ispoljenih klini kih znakova.

Rezultati izneti u ovoj tezi su tako e pokazali da su perivaskularni elijski infiltrati, kao i oni uo eni u površinskim delovima bele mase ki mene moždine, bili manji kod tretiranih pacova. S tim u vezi, morfometrijska analiza je pokazala da je ispitivana površina preseka ki mene moždine infiltrirana inflamatornim elijama bila zna ajno manja kod životinja tretiranih arilpiperazinima, dok je proto na citofluorimetrija potvrdila zna ajno smanjenje broja mononuklearnih elija infiltriranih u CNS kod pacova tretiranih arilpiperazinima. Sa druge strane, analiza brojnosti mononuklearnih elija u dreniraju im (poplitealnim) limfnim vorovima nije pokazala statisti ki zna ajnu promenu broja elija životinja tretiranih arilpiperazinima.

Rezultati *qRT-PCR-a* su pokazali da tretman arilpiperazinima zna ajno snižava ekspresiju iRNK ispitivanih inflamatornih medijatora (kao što su TNF, IL-6, IL-1, GM-CSF, IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1Ra, T-bet, ROR $\gamma$ t i Foxp3), u tkivu CNS-a u vrhuncu bolesti. S druge strane, analiza nivoa iRNK za proinflamatorne i antiinflamatorne medijatore u mononuklearnim elijama infiltriranim u CNS, nije pokazala zna ajne razlike izme u kontrolnih i životinja tretiranih arilpiperazinima.

Rezultati ove teze su tako e pokazali kvantifikacijom na proto nom citofluorimetru da nema zna ajne razlike u procentualnoj zastupljenosti rezli itih elijskih grupa, kao što su: CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD11b/c+, CD4+ IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>,

CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, i CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> elija u infiltratu mononuklearnih elija 14. dana EAE-a.

U skladu sa protektivnim efektom arilpiperazina, pokazana je značajno manja zastupljenost TUNEL-pozitivnih elijskih jedara na presecima kičmene moždine bolesnih tretiranih životinja, ukazuju i na to da tretman arilpiperazinima utiče na smanjenje apoptotske smrti elija CNS-a tokom EAE-a. Takođe je imunoblot analizom pokazano da arilpiperazini smanjuju aktivnost polimeraze PARP, koja je jedan od markera apoptoze.

U nastavku istraživanja mehanizama protektivnog dejstva arilpiperazina imunoblot analiza homogenata tkiva kičmene moždine imunizovanih pacova je pokazala da tretman značajno povećava fosforilaciju, a time i aktivnost antiapoptotskih molekula Akt i p70S6 kinaze, koja je direktan supstrat mTOR-a. Sa druge strane, imunoblot analiza nije otkrila značajnu promenu u stepenu fosforilacije tirozin kinaze Src, AMPK, i mTOR-a.

Rezultati *in vitro* eksperimenata su pokazali da mitogenom (ConA) stimulisane mononuklearne elije limfnog vora pacova, kao i antigenom (MBP) stimulisane mononuklearne elije dreniraju eg limfnog vora imunizovanih pacova značajno smanjuju vijabilitet oligodendrocitne elijske linije OLN93 i neuronske elijske linije PC12, dok je tretman arilpiperazinima delimično poništio ovaj citotoksični efekat. Ispitujući dalje mehanizam zaštitnog dejstva *in vitro*, analiza nivoa mRNA za proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-1, i GM-CSF, Th1 citokine IL-12 i IFN- $\gamma$ , Th17 citokine IL-23 i IL-17, anti-inflamatorne/imunosupresivne medijatore kao što su IL-10, TGF- $\beta$ , i IL-1Ra, kao i za transkripcione faktore uključujući polarizaciju Th1 elija (T-bet), Th17 elija (ROR $\gamma$ t) i regulatornih T elija (Foxp3) u mononuklearnim elijama, nije pokazala značajnu razliku između kontrolnih i elija tretiranih arilpiperazinima. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da arilpiperazini direktno štite oligodendrocitne i neuronske elije od oštećenja posredovanog imunskim elijama *in vitro*, bez ispoljavanja očigledne imunomodulatorne aktivnosti.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da arilpiperazini svoje protektivno dejstvo ostvaruju tokom efektorske faze bolesti, tako što smanjuju infiltraciju inflamatornih elija u CNS ne utičući na aktivaciju i ekspanziju mononuklearnih elija u perifernim limfoidnim organima. Na taj način, ova jedinjenja smanjuju ekspresiju inflamatornih medijatora u tkivu CNS-a, ne menjaju i pri tome ekspresiju istih molekula u infiltriranim mononuklearnim elijama i elijski sastav inflamatornog infiltrata. Arilpiperazini smanjuju apoptozu elija u CNS-u i povećavaju aktivnost antiapoptotskog signalnog puta Akt/p70S6 kinaza u CNS-u EAE pacova, dok *in vitro*

direktno štite oligodendrocite i neurone od oštećenja posredovanog T-elijama, bez direktnog imunomodulatornog dejstva.

### C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima literature

Rezultati ove teze su, korišćenjem pacovskog EAE modela MS-a, po prvi put pokazali *in vivo* sposobnost novosintetisanih arilpiperazinskih derivata 6a i 6b da smanje inflamaciju centralnog nervnog sistema posredovanu autoimunskom reakcijom. Protektivno dejstvo ovih jedinjenja ogledalo se u snižavanju maksimalne kliničke ocene bolesti, odlaganju i smanjenju infiltracije imunskih elija u CNS, smanjivanjem apoptoze, kao i porastom aktivnosti anti-apoptotskih kinaza Akt i p70S6K, bez prisustva oštećenog imunosupresivnog/imunomodulatornog dejstva.

Podaci iz literature pokazuju da farmakološki ligandi za dopaminske receptore mogu da imaju neuroprotektivno dejstvo, što je pokazano i u ovoj studiji. Povećanjem ekspresije i aktivnosti antioksidantnih enzima, stabilizacijom funkcije mitohondrija, kao i sprećavanjem aktivnosti proapoptotskih proteina, atipični antipsihotici inhibiraju apoptozu neurona, a ovo poslednje je bio slučaj i u ovoj tezi. Pored različitih neuroprotektivnih efekata, kao što su povećanje nivoa moždanog neurotrofičkog faktora (BDNF), povećanje proliferacije elija hipokampusa, indukcija rasta neurita, stimulacija proliferacije i preživljavanja progenitorskih nervnih elija, kao i smanjenje oštećenja oligodendrocita od strane IFN- $\gamma$  stimulisane mikroglije, arilpiperazini ispoljavaju i antiinflamatorna svojstva, kao što je inhibicija produkcije TNF- $\alpha$  indukovane LPS-om. Rezultat koji pokazuje efekat ispitivanih derivata u efektorskoj fazi bolesti je u skladu sa drugim radovima gde je uočeno da primena nekih drugih potencijalnih terapeutika u početnim fazama EAE-a nije bila efikasna u snižavanju kliničkih manifestacija bolesti.

Iako su prethodne studije pokazale da je zaštitni efekat dibenzodiazepinskog derivata kvetiapina, atipičnog antipsihotika sa piperazinskim prstenom, bio rezultat inhibicije proliferacije encefalitogenih T- elija u EAE-u, niz eksperimentalnih dokaza u ovoj studiji potvrđuje odsustvo direktnog imunomodulatornog dejstva arilpiperazina 6a i 6b. S druge strane, rezultati ove teze ukazuju na mogućnost da bi inhibitorno dejstvo arilpiperazina na inflamatornu infiltraciju CNS u EAE-u moglo da bude posledica njihovog direktnog neuroprotektivnog dejstva i posledičnog smanjenja oslobođenja molekulskih obrazaca oštećenja (DAMP). U skladu sa tim, prethodne *in vitro* studije pokazale su da arilpiperazini 6a i 6b štite neurone inhibicijom apoptoze i autofagije, i to stabilizacijom mitohondrijalnog membranskog potencijala i posledičnim sprećavanjem oksidativnog stresa, kao i sprećavanjem inaktivacije glavnog represora autofagije mTOR-a. Protektivno dejstvo arilpiperazina 6a je



prethodno pokazano u *in vitro* uslovima neurotoksi nosti LPS+IFN- $\gamma$  stimulisanih makrofaga koji osloba aju NO, što ukazuje na potencijalni terapijski zna aj arilpiperazina u le enju neuroinflamatornih i/ili neurodegenerativnih oboljenja u kojima je prekomerno aktivirana mikroglija jedan od glavnih izvora toksih, inflamatornih medijatora, uključujući i NO.

Po pitanju mehanizma koji se nalazi u osnovi direktne zaštite elija CNS-a posredovane arilpiperazinima, u nedavno objavljenoj studiji pokazano je da je aktivacija antiapoptotske kinaze Akt bila odgovorna za zaštitni efekat arilpiperazina 6a od neurotoksi nog dejstva slobodnog radikala NO. Tako e je prethodno pokazano da konstitutivno aktivna forma Akt-a spasava dopaminergičke neurone nakon ubrizgavanja neurotoksina 6-OHDA u mozak eksperimentalnih miševa. Tako e, Akt signalni put je uključen u otpornost SH-SY5Y elija na neurotoksin 6-OHDA nakon kontakta sa astrocitima, a nishodni efektor Akt-a, p70S6K, održava transkripciju i translaciju na nivou koji je neophodan da bi neuroni preživeli u uslovima apoptotskog stresa. Rezultati ove teze proširuju prethodna otkri a pokazuju i da arilpiperazini pove avaju fosforilaciju Akt-a i p70S6K u CNS-u pacova sa EAE-om. Ovo je u skladu sa nedavnim otkri em koje pokazuje da aktivacija estrogenskog receptora  $\beta$  na oligodendrocitima podstiče remijelinizaciju u EAE-u upravo putem aktivacije Akt/p70S6K signalnog puta, što ukazuje na mogućnost da je aktivacija Akt-a i p70S6K u CNS-u bar delimi no doprinela protektivnom dejstvu arilpiperazina u EAE-u. Zanimljivo je da u ovoj studiji nije prime en porast aktivacije mTOR-a u tretmanu arilpiperazinima, što se može objasniti sposobnoš u Akt-a da fosforiliše p70S6K nezavisno od mTOR-a, a što je pokazano u drugim studijama, i/ili aktivacijom drugih unutar elijskih signalnih puteva koji su u stanju da aktiviraju p70S6K nezavisno od Akt/mTOR puta, kao što su na primer aktivacija protein kinaze C i MAP kinaza.

Iako oba arilpiperazina ostvaruju parcijalnu agonisti ku aktivnost na D2 receptorima, njihov *in vitro* neuroprotektivni efekat u prethodnim studijama najverovatnije nije zavisio od vezivanja za dopaminske receptore, jer ga visokoafinitetni blokatori D1/D2 receptora nisu poništavali. Slični rezultati, u kojima neuroprotektivno dejstvo pojedinih dopaminergičkih liganada nije bilo smanjeno farmakološkom ili genetskom blokadom dopaminergičkih receptora, objavljeni su i u drugim radovima. Ipak, obzirom da arilpiperazinski derivati ispitivani u ovoj studiji deluju kao parcijalni agonisti humanih D2 receptora, kao i da se određeni afinitetom vezuju za serotonin ske 5HT<sub>1A</sub> receptore, moglo bi se očekivati da bar deo njihovog protektivnog dejstva u neuroinflamaciji zavisi od vezivanja za ove receptore. Nešto ve a efikasnost 6b, koja se ogledala u kasnijem po etku i nižem maksimalnom kliničkom skor u EAE-a, u skladu je sa njegovim ve im afinitetom za D2 i 5-HT<sub>1A</sub>

receptore. Ova pretpostavka je u skladu sa ranijim otkri ima koja pokazuju da parcijalni agonista D2 receptora bromokriptin smanjuje težinu akutnog EAE-a, dok antagonizam D2 receptora pogoršava bolest stimulisanjem diferencijacije Th17 elija.

#### **D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji ine deo teze**

1) Popovic M, Stanojevic Z, Tosic J, Isakovic A, Paunovic V, Petricevic S, Martinovic T, Ciric D, Kravic-Stevovic T, Soskic V, Kostic-Rajacic S, Shakib K, Bumbasirevic V, Trajkovic V. Neuroprotective arilpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Neurochem.* 2015 Oct;135:125-38.

(IF = 4.281)

#### **ZAKLJU AK (Obrazloženje nau nog doprinosa disertacije):**

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju zna ajan nau ni doprinos istraživa a u definisanju elijskih i molekularnih mehanizama u osnovi neuroprotektivnog delovanja arilpiperazinskih dopaminergih/serotonergih liganada u modelu MS-a. Sveobuhvatni pristup sagledavanju neuroprotektivnog dejstva obuhvatio je kako analizu klini kih i histoloških promena, tako i analizu aktivnosti antiapoptotskih intracelularnih signalnih puteva koriš enjem savremenih molekularno-bioloških tehnika. Novosintetisani arilpiperazinski dopaminergiki ligandi odlažu po etak i snižavaju klini ke znake EAE-a deluju i tokom efektorske, ali ne i induktivne faze bolesti. Arilpiperazini smanjuju inflamatorno ošte enje CNS-a najverovatnije direktnom aktivacijom antiapoptotskog Akt/p70S6 signalnog puta u elijama CNS-a, a ne imunomodulatornim dejstvom, što je pokazano i u *in vitro* uslovima direktnom protekcijom oligodendrocita i neurona od ošte enja posredovanog T elijama. Zbog svega navedenog ova disertacija je primer temeljnog i dobro osmišljenog istraživanja elijskih i molekularnih mehanizma odgovornih za terapijsku protekciju u najpoznatijem animalnom modelu MS-a. Rezultati ovog istraživanja doprinose razjašnjanju mehanizama koji se nalaze u osnovi zaštitnog efekta ispitivanih arilpiperazina u EAE-u i dodatno ukazuju na mogu e pravce za razvoj novih terapijskih pristupa u le enju MS-a.

## **F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija „Ispitivanje terapijskog dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u modelu multiple skleroze kod pacova“, kandidata Marjana Popovića, predstavlja originalan naučni doprinos u razjašnjavanju fizioloških i molekularnih mehanizama dejstva arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u EAE modelu multiple skleroze. Rezultati ove disertacije mogu da doprinesu razvoju novih terapijskih strategija u prevenciji neuroinflamacije u multiploj sklerozi i drugim neuroinflamatornim/neurodegenerativnim bolestima. Po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima, ova disertacija ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada, pa ova komisija predlaže Naukom u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da usvoji pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji Marjana Popovića i da odobri njenu javnu odbranu.

### **Mentor:**

\_\_\_\_\_  
prof. dr Vladimir Trajković

### **Komentor:**

\_\_\_\_\_  
prof. dr Aleksandra Isaković

### **Članovi Komisije:**

\_\_\_\_\_  
prof. dr Vera Pravica

\_\_\_\_\_  
prof. dr Dušan Popadić

\_\_\_\_\_  
prof. dr Silvana Andrić

\_\_\_\_\_  
VNS.dr. Miljana Momčilović

\_\_\_\_\_  
N.sar.dr. Verica Paunović

Beograd, 26. maj 2016. godine