

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Naučnog veća 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 Popovića, određena je komisija u sastavu:

1. prof. dr Vera Pravica - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. prof. dr Dušan Popadić - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. prof. dr Silvana Andrić - Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu
4. VNS. dr Miljana Momčilović - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu
5. N.sar.dr Verica Paunović - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Vladimir Trajković, a komentor prof. dr Aleksandra Isaković.

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, članovi komisije Naučnom veću Medicinskog fakulteta u Beogradu jednoglasno podnose sledeći

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 podeljen u 8 celina, kandidat daje podatke o etiologiji Multiple skleroze (MS) predstavljajući 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 ultra ljubičastom 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 njene kliničke manifestacije, navodeći 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 ćelijskom sastavu i rasprostranjenosti u centralnom nervnom sistemu, kao i o kliničkim posledicama patološke demijelinizacije aksona. U sedmoj celini kandidat se posebno osvrće na složenost ćelijskih i molekularnih mehanizama uključenih u imunopatogenezu MS-a, objašnjavajući doprinos $CD4^{+}$ i $CD8^{+}$ T ćelija specifičnih za mijelin, kao i doprinos B-ćelija i autoantitela u nastanku inflamacije nervog 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 podeljen u 4 celine, kandidat predstavlja prednosti animalnih modela u proučavanju ove bolesti, sa posebnim osvrtom na eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), čije odlike i puteve indukcije objašnjava u drugoj celini ovog odeljka. U

narednoj celini kandidat daje podatke o imunopatogenezi EAE-a, ulozi encefalitogenih T-ćelija 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 izučavanju MS-a, kao i njegova glavna ograničenja. U nastavku uvoda, u trećem odeljku, kandidat predstavlja osnovne podatke o arilpiperazinskim dopaminergičkim ligandima, čiji efekat na model EAE predstavlja temu ove teze. Iako je u prethodnim *in vitro* studijama pokazano da arilpiperazinski dopaminergički ligandi ostvaruju antiinflamatorno i neuroprotektivno dejstvo u različitim eksperimentalnim sistemima, do sada nije ispitivan njihov efekat u *in vivo* modelu autoimunske bolesti, kakav je EAE, iz čega proizilazi i **radna hipoteza** da bi arilpiperazinski dopaminergički ligandi mogli imati protektivno dejstvo i u modelu MS-a.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani: ispitivanje efekata arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada na klinički 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 korišćenih u istraživanju. Zatim je, u drugom odeljku, naveden način indukcije EAE-a, kao i način procene kliničkih znakova bolesti. U trećem odeljku ovog segmenta teze, kandidat opisuje tretman eksperimentalnih životinja arilpiperazinskim ligandima 6a i 6b. Četvrti odeljak se odnosi na opis pripreme ćelijskih suspenzija i kultivisanja ćelija, gde se daje opis medijuma za pripremu i kultivisanje ćelija; način izolovanja i određivanja broja ćelija limfnog čvora, kao i način izolovanja mononuklearnih ćelija kičmene moždine. Peti odeljak ovog segmenta teze pruža detaljan uvid u metodu protočne citofluorimetrije i izlaže ukratko protokole primenjene za specifična bojenja, u cilju detekcije membranskih molekula, kao i unutarćelijskih citokina. U šestom odeljku kandidat opisuje određivanje nivoa ekspresije gena, počevši od protokola za izolaciju RNK, preko reverzne transkripcije u cDNK, da bi se upotrebom navedenih specifičnih 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 unutarćelijskih kinaza Src, Akt, AMPK, p70S6K, kao i PARP polimeraze izložen je u sedmom odeljku. U ovom odeljku je opisan i način kvantifikacije aktivnosti specifičnih proteina primenom denzitometrijske analize korišćenjem kompjuterskog programa ImageJ. U narednom odeljku opisana je histološka analiza

uzoraka kičmene moždine pacova obojenih hematoksilin-eozinom (HE), pri čemu je morfometrijska analiza oblasti sa infiltratom mononuklearnih ćelija izvedena korišćenjem Fiji (ImageJ) softvera. U devetom odeljku ovog segmenta teze dat je opis načina detekcije apoptotskih ćelija sa fragmentiranom jedarnom DNK (TUNEL esej) u tkivu CNS-a. Deseti odeljak opisuje protokol za in vitro kokultivaciju oligodendrocitne ćelijske linije pacova (OLN93) i ćelijske linije feohromocitoma pacova (PC12) sa limfocitima neimunizovanih ili imunizovanih pacova stimuliranih mitogenom, odnosno antigenom. Potom kandidat opisuje kolorimetrijsko određivanje ćelijskog vijabiliteta OLN93 i PC12 ćelija upotrebom MTT metode. Jedanaesti odeljak ovog segmenta teze daje prikaz statističkih metoda korišćenih u analizi podataka. Za poređenje rezultata dobijenih za nezavisne uzorke korišćen je parametarski – Studentov t-test ili jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

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 kliničke znake EAE-a. Prikazani su rezultati ispitivanja akutne toksičnosti i moguće interferencije sa kliničkim znacima EAE-a u tretmanu arilpiperazinima 6a i 6b, kao i njihov uticaj na kliničke znake i promenu telesne mase u kontinuiranom tretmanu arilpiperazinima u EAE-u.

Zatim su, u drugom odeljku, izloženi rezultati ispitivanja uticaja arilpiperazina na kliničke znake EAE-a tokom selektivnog tretmana samo u induktivnoj ili efektorskoj fazi bolesti. Treći odeljak se odnosi na ispitivanje uticaja arilpiperazina na infiltraciju imunskih ćelija u centralni nervni sistem tokom EAE-a, kao i na brojnost mononuklearnih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima. 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 γ t, TGF- β , TNF, GM-CSF, IL-17, IL-1Ra, IFN γ , IL-10, Foxp3, T-bet i IL-1 β u tkivu centralnog nervnog sistema, kao i u mononuklearnim ćelijama infiltriranim u centralni nervni sistem tokom EAE-a. Peti odeljak se odnosi na rezultate istraživanja uticaja arilpiperazina na zastupljenost različitih ćelijskih populacija, i njihove produkcije citokina, kao što su CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD11b/c+, CD4+IFN γ +, CD4+IL10+, CD4+IL17+, CD8+IFN γ + i CD8+IL10+ ćelije u infiltratu mononuklearnih ćelija tokom EAE-a. Šesti odeljak se odnosi na dalje ispitivanje mehanizama pokazanog

protektivnog dejstva arilpiperazina *in vivo*, s čim u vezi su prikazani rezultati istraživanja uticaja arilpiperazina na apoptozu u kičmenoj moždini pacova sa EAE-om, kao i njihov uticaj na aktivnost Akt/mTOR signalnog puta, posebno obraćajući pažnju na aktivnost kinaza Src, Akt, AMPK, mTOR, p70S6k, kao i aktivnost apoptotskog markera PARP u homogenatu kičmene 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 ćelijskih linija OLN93 i PC12, kokultivisanih sa mitogenom-stimulisanim mononuklearnim ćelijama normalnog limfnog čvora, odnosno sa antigenom (MBP) stimulisanim mononuklearnim ćelijama drenirajućeg limfnog čvora 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 γ t, TGF- β , TNF, GM-CSF, IL-17, IL-1Ra, IFN γ , IL-10, Foxp3, T-bet i IL-1 β u nespecifično i specifično stimulisanim mononuklearnim ćelijama limfnog čvora *in vitro*.

Svaki rezultat je analiziran na odgovarajući način, i na osnovu njega je izveden jasan i logičan zaključak.

U poglavlju **DISKUSIJA**, koje je izloženo na 11 strana, rezultati istraživanja su razmatrani na sveobuhvatan način i tumačeni u skladu sa podacima iz literature. Prvi deo diskusije se odnosi na ispitivanje delovanja arilpiperazinskih dopaminergičkih liganada u različitim fazama EAE-a, da bi u nastavku bio razmatran ćelijski i molekularni mehanizam neuroprotektivnog delovanja arilpiperazina. Analizom rezultata pokazano je značajno smanjenje broja ćelija infiltriranih u centralni nervni sistem bez uticaja na ekspresiju najznačajnijih transkripcionih faktora i citokina koji su uključeni u inflamaciju CNS-a, zatim odsustvo uticaja na promenu ćelijskog sastava inflamatornih infiltrata, smanjenje apoptoze ćelija centralnog nervnog sistema, kao i *in vitro* spašavanje oligodendrocitnih i neuronskih ćelijskih linija, što je diskutovano u kontekstu poznatih podataka iz literature. Kao jedan od mogućih mehanizama koji dovodi do neuroprotekcije razmatrano je povećanje aktivnosti Akt/mTOR signalnog puta, čiji značaj u preživljavanju ćelija je dobro poznat iz prethodno objavljenih studija.

U poglavlju **ZAKLJUČAK** kandidat je iz svojih rezultata izveo jasne i nedvosmislene zaključke, 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 toksičnost ni efekte koji bi mogli da interferiraju sa kliničkim znacima EAE-a. Pokazano je da oba tretmana značajno snižavaju kliničke manifestacije EAE-a u više vremenskih tačaka, pri čemu je derivat 6b imao izraženije protektivno dejstvo. Dodatne analize su pokazale da je početak bolesti bio odložen, a zbirna klinička ocena značajno niža u grupi životinja tretiranih arilpiperazinima. Zbog bolje efikasnosti derivat 6b je uglavnom korišćen u narednim eksperimentima. Analiza promene telesne mase životinja je pokazala da tretman arilpiperazinima sprečava gubitak telesne mase, što je dodatno potvrdilo njihovo protektivno dejstvo. Da bi se detaljnije ispitala faza bolesti u kojoj ispitivani derivati ispoljavaju zaštitni efekat izveden je niz eksperimenata koji su pokazali da za razliku od kontinuiranog tretmana nikakav zaštitni efekat nije primećen kod pacova tretiranih arilpiperazinima tokom induktivne faze EAE-a. Suprotno tome, kada su eksperimentalne životinje tretirane tokom efektorske faze bolesti primećena je mnogo blaža forma EAE-a, što se manifestovalo značajno nižim ocenama ispoljenih kliničkih znakova.

Rezultati izneti u ovoj tezi su takođe pokazali da su perivaskularni ćelijski infiltrati, kao i oni uočeni u površinskim delovima bele mase kičmene moždine, bili manji kod tretiranih pacova. S tim u vezi, morfometrijska analiza je pokazala da je ispitivana površina preseka kičmene moždine infiltrirana inflamatornim ćelijama bila značajno manja kod životinja tretiranih arilpiperazinima, dok je protočna citofluorimetrija potvrdila značajno smanjenje broja mononuklearnih ćelija infiltriranih u CNS kod pacova tretiranih arilpiperazinima. Sa druge strane, analiza brojnosti mononuklearnih ćelija u drenirajućim (poplitealnim) limfnim čvorovima nije pokazala statistički značajan promenu broja ćelija životinja tretiranih arilpiperazinima.

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

Rezultati ove teze su takođe pokazali kvantifikacijom na protočnom citofluorimetru da nema značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti različitih ćelijskih grupa, kao što su: CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD11b/c+, CD4+ IFN- γ ⁺,

CD4⁺ IL-17⁺, CD4⁺ IL-10⁺, CD8⁺ IFN- γ ⁺, i CD8⁺ IL-10⁺ ćelija u infiltratu mononuklearnih ćelija 14. dana EAE-a.

U skladu sa protektivnim efektom arilpiperazina, pokazana je značajno manja zastupljenost TUNEL-pozitivnih ćelijskih jedara na presecima kičmene moždine bolesnih tretiranih životinja, ukazujući na to da tretman arilpiperazinima utiče na smanjenje apoptotske smrti ćelija 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 ćelije limfnog čvora pacova, kao i antigenom (MBP) stimulisane mononuklearne ćelije drenirajućeg limfnog čvora imunizovanih pacova značajno smanjuju vijabilitet oligodendrocitne ćelijske linije OLN93 i neuronske ćelijske linije PC12, dok je tretman arilpiperazinima delimično poništio ovaj citotoksični efekat. Ispitujući dalje mehanizam zaštitnog dejstva *in vitro*, analiza nivoa iRNK za proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-1, i GM-CSF, Th1 citokine IL-12 i IFN- γ , Th17 citokine IL-23 i IL-17, anti-inflamatorne/imunosupresivne medijatore kao što su IL-10, TGF- β , i IL-1Ra, kao i za transkripcione faktore ključne u polarizaciji Th1 ćelija (T-bet), Th17 ćelija (ROR γ t) i regulatornih T ćelija (Foxp3) u mononuklearnim ćelijama, nije pokazala značajnu razliku između kontrolnih i ćelija tretiranih arilpiperazinima. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da arilpiperazini direktno štite oligodendrocitne i neuronske ćelije od oštećenja posredovanog imunskim ćelijama *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 ćelija u CNS ne utičući na aktivaciju i ekspanziju mononuklearnih ćelija u perifernim limfoidnim organima. Na taj način, ova jedinjenja smanjuju ekspresiju inflamatornih medijatora u tkivu CNS-a, ne menjajući pri tome ekspresiju istih molekula u infiltriranim mononuklearnim ćelijama i ćelijski sastav inflamatornog infiltrata. Arilpiperazini smanjuju apoptozu ćelija 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-ćelijama, 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 ćelija u CNS, smanjivanjem apoptoze, kao i porastom aktivnosti anti-apoptotskih kinaza Akt i p70S6K, bez prisustva očiglednog 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 sprečavanjem 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 ćelija hipokampusa, indukcija rasta neurita, stimulacija proliferacije i preživljavanja progenitorskih nervnih ćelija, kao i smanjenje oštećenja oligodendrocita od strane IFN- γ stimulisane mikroglije, arilpiperazini ispoljavaju i antiinflamatorna svojstva, kao što je inhibicija produkcije TNF- α 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-ćelija 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 oslobađanja molekulskih obrazaca oštećenja (DAMP). U skladu sa tim, prethodne *in vitro* studije pokazale su da arilpiperazini 6a i 6 štite neurone inhibicijom apoptoze i autofagije, i to stabilizacijom mitohondrijalnog membranskog potencijala i posledičnim sprečavanjem oksidativnog stresa, kao i sprečavanjem inaktivacije glavnog represora autofagije mTOR-a. Protektivno dejstvo arilpiperazina 6a je

prethodno pokazano u *in vitro* uslovima neurotoksičnosti LPS+IFN- γ stimulisanih makrofaga koji oslobađaju NO, što ukazuje na potencijalni terapijski značaj arilpiperazina u lečenju neuroinflamatornih i/ili neurodegenerativnih oboljenja u kojima je prekomerno aktivirana mikroglija jedan od glavnih izvora toksičnih, inflamatornih medijatora, uključujući i NO.

Po pitanju mehanizma koji se nalazi u osnovi direktne zaštite ćelija CNS-a posredovane arilpiperazinima, u nedavno objavljenoj studiji pokazano je da je aktivacija antiapoptotske kinaze Akt bila odgovorna za zaštitni efekat arilpiperazina 6a od neurotoksičnog dejstva slobodnog radikala NO. Takođe je prethodno pokazano da konstitutivno aktivna forma Akt-a spasava dopaminergičke neurone nakon ubrizgavanja neurotoksina 6-OHDA u mozak eksperimentalnih miševa. Takođe, Akt signalni put je uključen u otpornost SH-SY5Y ćelija 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 otkrića pokazujući da arilpiperazini povećavaju fosforilaciju Akt-a i p70S6K u CNS-u pacova sa EAE-om. Ovo je u skladu sa nedavnim otkrićem koje pokazuje da aktivacija estrogenskog receptora β 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 delimično doprinela protektivnom dejstvu arilpiperazina u EAE-u. Zanimljivo je da u ovoj studiji nije primećen porast aktivacije mTOR-a u tretmanu arilpiperazinima, što se može objasniti sposobnošću Akt-a da fosforiliše p70S6K nezavisno od mTOR-a, a što je pokazano u drugim studijama, i/ili aktivacijom drugih unutarćelijskih 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 agonističku 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 određenim afinitetom vezuju za serotonin ske 5HT_{1A} receptore, moglo bi se očekivati da bar deo njihovog protektivnog dejstva u neuroinflamaciji zavisi od vezivanja za ove receptore. Nešto veća efikasnost 6b, koja se ogledala u kasnijem početku i nižem maksimalnom kliničkom skor u EAE-a, u skladu je sa njegovim većim afinitetom za D2 i 5-HT_{1A}

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

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine 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 arylpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Neurochem*. 2015 Oct;135:125-38.

(IF = 4.281)

ZAKLJUČAK (Obrazloženje naučnog doprinosa disertacije):

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju značajan naučni doprinos istraživača u definisanju ćelijskih i molekularnih mehanizama u osnovi neuroprotektivnog delovanja arilpiperazinskih dopaminergičkih/serotonineričkih liganada u modelu MS-a. Sveobuhvatni pristup sagledavanju neuroprotektivnog dejstva obuhvatio je kako analizu kliničkih i histoloških promena, tako i analizu aktivnosti antiapoptotskih intracelularnih signalnih puteva korišćenjem savremenih molekularno-bioloških tehnika. Novosintetisani arilpiperazinski dopaminergički ligandi odlažu početak i snižavaju kliničke znake EAE-a delujući tokom efektorske, ali ne i induktivne faze bolesti. Arilpiperazini smanjuju inflamatorno oštećenje CNS-a najverovatnije direktnom aktivacijom antiapoptotskog Akt/p70S6 signalnog puta u ćelijama CNS-a, a ne imunomodulatornim dejstvom, što je pokazano i u *in vitro* uslovima direktnom protekcijom oligodendrocita i neurona od oštećenja posredovanog T ćelijama. Zbog svega navedenog ova disertacija je primer temeljnog i dobro osmišljenog istraživanja ćelijskih i molekularnih mehanizma odgovornih za terapijsku protekciju u najpoznatijem animalnom modelu MS-a. Rezultati ovog istraživanja doprinose razjašnjavanju mehanizama koji se nalaze u osnovi zaštitnog efekta ispitivanih arilpiperazina u EAE-u i dodatno ukazuju na moguće pravce za razvoj novih terapijskih pristupa u lečenju 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 ćelijskih 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 Naučnom veću 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