

Биолошки факултет
Број захтева: 33/8-1
Датум: 29.01.2016.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Ива Д. Божић**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Експериментална неуробиологија: од гена до понашања.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина (S-benzoyltiamin O-monofosfat) у активираној ћелијској линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 26.02.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-680/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 13.11.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/257-13.11.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Ирена Лаврња	виши научни сарадник	неуробиологија	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
2.	др Надежда Недељковић	редовни професор	неуробиологија	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
3.	др Соња Пековић	научни саветник	неуробиологија	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 29. јануара 2016. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Жељко Томановић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/8-29.01.2016.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IV редовној седници одржаној 29.01.2016. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Иве Божић, под називом:

„Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева“.

Универзитет је дана 26.02.2015. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-680/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Bozic I**, Savic D, Laketa D, Vjelobaba I, Milenkovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavnja I (2015). Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. PLoS One. 10(2):e0118372. **(IF 3.234) M21**

2. **Bozic I**, Savic D, Stevanovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I (2015). Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9:351. **(IF 4.289) M23**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Жељко Томановић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.11.2015. године, одређена је Комисија за преглед и оцену завршене докторске тезе **Иве Д. Божић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под називом „**Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева**“. Након детаљног прегледа докторске тезе, Комисија у саставу др Ирена Лаврња, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, проф. др Надежда Недељковић, редовни професор Биолошког факултета и др Сања Пековић, научни саветник Института за биолошка истраживања “Синиша Станковић” подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Иве Божић, под насловом „**Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева**“ написана је на 130 страна, а резултати су илустровани графицима (20) и микрографијама (4). Дисертација садржи укупно 29 слика и 8 табела. Текст је организован у уобичајена поглавља, Увод (33 стране), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (25 страна), Резултати (33 стране), Дискусија (24 стране), Закључци (2 стране) и Литература (30 страна). На крају текста налази се поглавље Додатак (37 страна), које садржи копије оригиналних радова, чији су резултати саставни део ове тезе.

Експериментални део докторске дисертације урађен је на Одељењу за неуробиологију на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Анализа докторске дисертације:

Увод докторске дисертације подељен је у седам одељака, у којима је дат детаљан приказ досадашњих знања о улози активираних микроглија у неуроинфламацији и последичној неуродегенерацији, као и о терапијском потенцијалу бенфотиамина. У првом одељку описан је процес неуроинфламације и назначена је улога микроглије. Следи детаљан опис порекла микроглије и улога које ове ћелије обављају у физиолошким условима. Приказане су затим морфолошке и функцијске промене кроз које микроглија пролази током активације. У наредном одељку описан је процес којим активирани микроглија доприноси оштећењу неурона, а затим је у следећим одељцима приказана

улога појединачних медијатора у инфламаторном процесу – проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-6, антиинфламаторног цитокина IL-10, азот-моноксида и циклооксигеназе 2. Посебна пажња посвећена је улози коју има оксидативни стрес током активације микроглије, а описани су и главни антиоксидативни процеси. У следећем одељку изложени су доминантни сигнални путеви у активацији микроглије: MAPK, PI3K/Akt, као и NF- κ B транскрипциони фактор. Описан је и *in vitro* модел неуроинфламације коришћен у експерименталном раду. Коначно, у последњем одељку Увода обрађен је терапијски потенцијал бенфотиамина, уз посебан осврт на позната повољна дејства у различитим болестима и модел системима и његова антиинфламаторна и антиоксидативна својства.

У поглављу **Циљеви**, као основни циљ докторске дисертације истиче се испитивање антиинфламаторног и антиоксидативног ефекта бенфотиамина, у моделу активираних БВ-2 ћелијске линије микроглије. Полазећи од овог основног циља, кандидаткиња формулише низ прелазних циљева, који се односе на утврђивања ефекта бенфотиамина у погледу промена морфологије и величине БВ-2 ћелија, ослобађања проинфламаторних и антиинфламаторних медијатора, као и на идентификацију сигналних путева чијом модулацијом бенфотиамин остварује ефекат.

Поглавље **Материјал и методе** организовано је у неколико одељака, који садрже веома прегледан приказ коришћених материјала и веома темељан опис примењених метода. Између осталих, описан је поступак успостављања и одржавања БВ-2 ћелијске линије, активација ћелија бактеријским липополисахаридом (ЛПС) и третман бенфотиамином. Описани су тестови испитивања вијабилности и морфологије ћелија, имунодетекције нивоа ослобођених цитокина (ЕЛИСА), процес ланчаног умножавања полимеразом (ПЦР) у реалном времену, поступак имуноблотинга, методе имуноцитохемијског и флуоресцентног обележавања ћелија, поступак проточне цитофлуорометрије, као и сет спекторфотометријских метода за одређивање активности антиоксидативних ензима и система. На крају је описан поступак хемилуминесцентног мерења унутарћелијске концентрације аденозин-трифосфата (АТР).

Поглавље **Резултати** подељено је у четири тематске целине. У првом делу приказан је утицај бенфотиамина на вијабилност и морфологију нестимулисаних и ЛПС-стимулисаних БВ-2 ћелија. Показано је да бенфотиамин не умањује преживљавање ћелија у култури, како контролних (нестимулисаних), тако и ћелија које су стимулисане ЛПС-ом. Функцијски статус нестимулисаних и ЛПС-стимулисаних БВ-2 ћелија анализиран је применом РТЦА апарата, који је с једне стране, потврдио одсуство утицаја бенфотиамина на преживљавање, морфологију и адхезију нестимулисаних БВ-2 ћелија, као и снажну активацију ЛПС-стимулисаних ћелија. Исти поступак показао је да претретман стимулисаних ћелија бенфотиамином успоставља вредности ћелијског индекса које су детектоване код контролних култура. Бенфотиамин значајно мења морфологију стимулисаних БВ-2 ћелија, смањујући величину ћелијског тела, уз пратећи реаранжман актинских микрофиламената и повећање броја наставака са израженим микропројекцијама. Анализа проточном цитофлуориметријом показала је да ЛПС изазива благи пораст апоптозе и некрозе међу БВ-2 ћелијама, док бенфотиамин не остварује ефекат.

У другом делу приказан је ефекат бенфотиамина на синтезу и ослобађање проинфламаторних и антиинфламаторних фактора у БВ-2 ћелијама након стимулације ЛПС-ом. Бенфотиамин смањује ЛПС-ом индуковану експресију имунорегулаторног рецептора CD40, продукцију једног од главних проинфламаторних медијатора, азот-моноксида (NO), смањује генску и протеинску експресију индуцибилне азот-оксид синтазе, генску и протеинску експресију циклооксигеназе 2 (COX-2), што све заједно јасно указује на антиинфламаторна својства бенфотиамина. Показано је, такође да бенфотиамин значајно смањује како продукцију, тако и ослобађање проинфламаторних

citoкина TNF- α и IL-6, и повећава ослобађање антиинфламаторног citoкина IL-10, што указује на имunosupresivни потенцијал бенфотиамина.

У трећем делу приказани су резултати испитивања антиоксидативних својстава бенфотиамина. У ћелијама, код којих стимулација ЛПС-ом доводи до снажног оксидативног стреса, бенфотиамин смањује концентрације свих мерених реактивних врста и повећава генску, протеинску и/или функцијску експресију антиоксидативних ензима, манган супероксид-дисмутазе, бакар, цинк супероксид-дисмутазе, каталазе и глутатион редуктазе, а повећава и ниво главног антиоксидативног система у ћелији, глутатиона. Мерење унутарћелијске концентрације АТР, показало је да бенфотиамин повећава садржај главног енергетског молекула у ћелијама, што упућује на закључак да доводи до побољшања енергетског статуса BV-2 ћелија.

У последњем делу приказан је утицај бенфотиамина на сигналне путеве који су активирани у BV-2 ћелијама стимулираним ЛПС-ом. Показано је да бенфотиамин интерферира са главним сигналним каскадама, смањујући активацију ERK и JNK MAPK каскаде, као и PI3K/Akt сигналног пута. Анализирана је и активација NF- κ B транскрипционог фактора и утврђено је да бенфотиамин директно смањује његову активацију, изазвану ЛПС-ом. С обзиром на то да ови сигнални путеви имају кључну улогу у активацији микроглије закључено је да бенфотиамин свој антиинфламаторни и антиоксидативни ефекат остварује смањујући активацију наведених сигналних каскада.

У поглављу **Дискусија** анализирани су добијени резултати уз поређење са литературним подацима. С обзиром на то да бенфотиамин испољава снажан антиинфламаторни, имunosupresivни и антиоксидативни потенцијал, без утицаја на вијабилност BV-2 ћелија, закључено је да бенфотиамин може имати потенцијалну терапеутску примену. Анализиран је утицај бенфотиамина на морфолошке промене и експресију и ослобађање свих појединих проинфламаторних и антиинфламаторних медијатора. Посебно је дискутована улога оксидативног стреса у активацији микроглије, као и значај показаних антиоксидативних својстава бенфотиамина. Анализирани су сигнални путеви укључени у активацију и закључено је да је ефекат који бенфотиамин остварује на NF- κ B транскрипциони фактор, као и ERK, JNK и PI3K/Akt сигналне каскаде у основи показаног антиинфламаторног и антиоксидативног дејства.

У поглављу **Закључци** сумирани су резултати приказани у овој докторској дисертацији. На основу свих наведених резултата, кандидаткиња као главни закључак износи да бенфотиамин показује антиинфламаторно, имunosupresivно и антиоксидативно дејство у активираној микроглији и да стога може бити потенцијални терапеутик у лечењу неуродегенеративних обољења која се одликују хроничном инфламацијом.

У поглављу **Литература** дата је листа коју чине 391 библиографске јединице. Наведене научне публикације су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на одговарајућем месту.

У делу **Додатак** налазе се копије оригиналних радова који су објављени са резултатима проистеклим из ове докторске тезе.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Bozic I**, Savic D, Laketa D, Bjelobaba I, Milenkovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, M21 Lavrnja I (2015). Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. PLoS One. 10(2):e0118372. (IF 3.234)
2. **Bozic I**, Savic D, Stevanovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I (2015). M21 Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Bozic I**, Savic D, Stevanovic I, Laketa D, Jovanovic M, Pekovic S, Nedeljkovic N, M34
Lavrnja I (2015). Benfotiamine alleviates oxidative stress in LPS stimulated BV-2
microglia. FFRM Thessaloniki, 7-10 October, Thessaloniki, Greece, Abstract.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Bozic I**, Savic, D, Nedeljkovic N, Stojiljkovic M, Pekovic S, Lavrnja I. Uticaj S- M64
benzoiltiamin O-monofosfata na aktiviranu mikrogliju in vitro. VI Kongres Društva
za neuronauke Srbije (2013) Beograd, Srbija, Knjiga apstrakata 62.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Иве Божић**, под називом: „**Антиинфламаторна и антиоксидативна својства бенфотиамина у активираној линији микроглијских ћелија миша: улога проинфламаторних сигналних путева**“, представља оригиналан научни допринос разумевању процеса неуроинфламаторне активације микроглије, као и могуће примене синтетског деривата витамина Б1, бенфотиамина, у терапији неуролошких стања која су повезана са хроничном микроглиозом. Истраживања у оквиру тезе реализована су применом савремених молекуларно-биолошких, биохемијских, имунохемијских и спектрохемијских метода, и функцијских есеја и тестова. Резултати добијени у оквиру ове докторске тезе јасно показују да бенфотиамин умањује микроглиозу, модулишући морфолошке и функционалне аспекте овог процеса. На тај начин бенфотиамин испољава снажан имуносупресивни, антиинфламаторни и антиоксидативни потенцијал и као такав се може примењивати у терапији стања повезаних са неуроинфламацијом. Резултати добијени у оквиру ове докторске тезе објављени су у престижним часописима категорије М21, PLoS One и Frontiers in Cellular Neurosciences, а оба научна рада Ива Божић је потписала као први аутор.

Сумирајући све наведено, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Иви Божић** јавну одбрану докторске тезе.

КОМИСИЈА:

У Београду, 23.12.2015. године

др Ирена Лаврња, виши научни сарадник, Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Надежда Недељковић, редовни професор
Биолошки факултет-Универзитет у Београду

др Сања Пековић, научни саветник, Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић“