

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**  
**КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ**

**Предмет:** Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата маг. фарм.-мед. биохем. Јоване Аранђеловић

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 23.06.2022. године, Одлуком број 1392/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата маг. фарм.-мед. биохем. Јоване Аранђеловић, под насловом:

**„Бимодална модулација алфа5 GABA<sub>A</sub> рецептора у експерименталном моделу Алцхајмерове болести“**

Комисија у саставу:

1. Др Бојан Батинић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет, председник
2. Др Лидија Тодоровић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Лабораторија за радиобиологију и молекуларну генетику, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију
3. Др Александар Трбовић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Медицински факултет

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду следећи:

**ИЗВЕШТАЈ**

**А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Докторска дисертација маг. фарм.-мед. биохем. Јоване Аранђеловић, под називом „Бимодална модулација алфа5 GABA<sub>A</sub> рецептора у експерименталном моделу Алцхајмерове болести“, написана је на 74 стране са једноструким проредом и организована у следећих 7 целина: Увод (11 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и

методе (11 страна), Резултати (28 страна), Дискусија (8 страна), Закључак (1 страна) и Литература (14 страна). На почетку, докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику и садржај поглавља/потпоглавља, а на крају кратку биографију кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 15 слика и 7 табела. Преглед литературе садржи 169 навода.

**Увод** садржи преглед информација из литературних извора који су од значаја за теоријску основу истраживања која су спроведена у оквиру докторске дисертације. У првом делу описана је патогенеза Алцхајмерове болести (*Alzheimer's disease, AD*). Након тога су наведени животињски модели *AD*, који се користе у истраживању, као и структуре мозга (префронтални кортекс и хипокампус) које су релевантне у овој патологији. Представљени су познати литературни подаци о модулацији *GABA<sub>A</sub>* рецептора у *AD*. Наведена је специфична локализација и функција  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора у *AD*, и резултати из претходних студија за позитиван (ПАМ) и негативан алостерни модулатор (НАМ)  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* који су коришћени у овој студији: *MP-III-022*, односно *PWZ-029*. Утицај позитивне и негативне модулације ових рецептора на когницију, социјабилност, и некогнитивно понашање је елабориран у наставку.

У другом делу представљени су познати подаци о процесу неуроинфламације у структурама мозга које су од значаја за *AD*. Такође, наведени су подаци о променама експресије гена за субјединице *GABA<sub>A</sub>* рецептора у префронталном кортексу и хипокампусу код *AD*. Као закључни параграф увода, наведен је генерални дизајн студије.

**Циљеви рада** су били да се испита потенцијални повољан ефекат *MP-III-022* и *PWZ-029* на когницију и остале домене понашања, да се установи ниво валидности тестираног анималног модела, и да се процене утицаји ових лиганада на промене генске експресије маркера неуроинфламације и субјединица *GABA<sub>A</sub>* рецептора у префронталном кортексу и хипокампусу. Конкретно, у сврху реализације истраживања дефинисани су циљеви који су обухватили: 1. Профилисање кинетичког понашања одабраног ПАМ и НАМ у условима продужене примене, са циљем одређивања дозе за даље експерименте, 2. Бихејвиорална карактеризација *5xFAD* мишева оба пола као модела *AD*, 3. Праћење ефеката након продужене примене ПАМ и НАМ код трансгених и нетрансгених (контролних) *5xFAD* мишева оба пола у бихејвиоралној батерији са циљем да се испитају следећи домени понашања: неуролошки, сензорномоторна способност, анксиозност, локомоторна активност, меморија код оба пола, 4. Одређивање нивоа експресије иРНК маркера инфламације, микроглиозе, астроцитозе и *GABA*ергичке трансмисије у моделу *AD* у регионима мозга одговорним за когницију (*PFC* и *HC*) код оба пола 5. Одређивање утицаја примене лиганада на нивое експресије иРНК маркера инфламације, микроглиозе, астроцитозе и *GABA*ергичке трансмисије у моделу *AD* у регионима мозга одговорним за когницију (*PFC* и *HC*) код оба пола.

Циљеви рада су добро постављени.

Поглавље **Материјал и методе** даје детаљан опис коришћене методологије и организовано је у 12 потпоглавља: Супстанце, Животиње и експериментални дизајн, Фармакокинетичка студија, Бихејвиорални тестови, Тестови за процену сензорномоторне

функције, Уздигнути плус лавиринт (*elevated plus maze, ЕПМ*), Тест отвореног поља (*Open field, OF*), Тест препознавања нових објеката (*novel object recognition test, NORT*), Тест са три коморе (*3 chamber test, 3ct*), Морисов водени лавиринт (*Morris water maze, MWM*), Изолација РНК, реверзна транскрипција и *qPCR*, Статистичка анализа.

Током истраживања употребљено је 154 *5xFAD* миша и 42 *C57BL/6J* миша. Све експерименталне процедуре спроведене су у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја под насловом „Бихејвиорални ефекти понављане примене новосинтетисаних супстанци селективних за поједине подтипове *GABA<sub>A</sub>* рецептора: поређење са стандардним психофармаколошким лековима” (2011-2019). Приликом рада са експерименталним животињама примењивани су етички принципи дефинисани Правилником за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и ЕУ директивом 2010/63/ЕУ.

Пре почетка експеримената у склопу бихејвиоралне батерије *5xFAD* мишева као модела *AD*, установљена је доза којом су биле третиране животиње пре уласка у студију. Фармакокинетичка студија је утврдила да би доза од 5 мг/кг била блиска оптималној за продужени третман у трајању од 10 дана са оба лиганда, *PWZ-029* и *MP-III-022*, на основу прерачунате слободне концентрације лиганда која би била постигнута у мозгу, како би се у бихејвиоралним експериментима постигла селективност за  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецепторе праћена знатном позитивном или негативном модулацијом ових рецептора.

Третман са *PWZ-029*, *MP-III-022* или растварачем примењиван је и.п. једном дневно у току 10 дана *5xFAD* трансгеним (тест група животиња) и нетрансгеним животињама (контролне животиње) оба пола, старости шест месеци, након чега су све животиње подвргнуте бихејвиоралним експериментима. Животиње су биле подељене у три исте узастопно евалуиране субкохорте које су пролазиле бихејвиоралну батерију.

Бихејвиорална батерија се састојала из следећих тестова: тестови за испитивање рефлекса и моторике, уздигнути плус лавиринт (*elevated plus maze; ЕПМ*), тест отвореног поља (*open field; OF*), тест препознавања новог објекта (*novel object recognition test; NORT*), тест три просторије, Морисов водени лавиринт и тест проналажења хране (*food localization test*). На овај начин су процењене сензомоторна функција, анксиозност, локомоторна активност, социјабилност и меморија након примене супстанци.

Добијени резултати су анализирани трофакторским АНОВА тестом или трофакторском АНОВА-ом са понављањем где је било потребно, са Сидак *post hoc* тестом. Непараметарски *Mann-Whitney* тест потврђивао је разлике између група из параметарских тестова за податке који нису прошли нормалну расподелу (*Shapiro-Wilk* тест) из *NORT*-а, *SIT*-а, *SRT*-а, *MWM*-а и *qPCR*-а за маркере неуроинфламације.

Након бихејвиоралних тестова, узорци префронталног кортекса и хипокампуса су анализирани *qPCR* методом. После изолације (по Тризол протоколу) и квантификације РНК (на *BioSpec* Нано спектофотометру) у узорцима, РНК је преведена у комплементарну ДНК која је после детектована на *real time* ланчаној реакцији полимеразе (*qPCR*) у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију. Коришћени су прајмери за гене од интереса: за субјединице *GABA<sub>A</sub>* рецептора (*Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra5*), за маркере астроцита (*Gfap*) и микроглије (*Iba-1*), за проинфламаторне цитокине (*Il-6*, *Il-1b* и *Tnf-a*), као и за *Actb* (бета актин) као *house-keeping* ген.

Експресија РНК за субјединице  $GABA_A$  рецептора анализирана је двофакторском АНОВА-ом (фактори: генотип и третман) за сваки пол, а параметри неуроинфламације су анализирани трофакторском АНОВА (фактори: генотип, третман, пол), а *post hoc* тест је био *Sidak*.

Подаци су били анализирани помоћу *IBM SPSS Statistics 25* софтвера.

Примењена методологија је адекватна за реализацију постављених циљева.

**Резултати** истраживања приказани су на прегледан начин, текстуално и графички, коришћењем 9 слика и 3 табеле. Груписани су у 9 целина: Фармакокинетичка студија, Тестови за процену сензорно-моторне функције, Тест отвореног поља (*OF*), Резултати у узигнутом плус лавиринту (*EPM*), Резултати за објектну меморију, Социјална интеракција и социјално препознавање, Морисов водени лавиринт (*MWM*), *PCR* резултати, Резултати непараметарске статистике *SRT*, *MWM* и *qPCR* (за генску експресију параметара неуроинфламације).

**Дискусија** садржи анализу добијених експерименталних резултата на бази које су донети одговарајући закључци истраживања, уз преглед и поређење са резултатима који су доступни у литератури. Поглавље **Дискусија** написано је у осам целина: Фармакокинетички профил коришћених ПАМ и НАМ, ПАМ и НАМ ефекти на објектну меморију, ПАМ и НАМ ефекти на социјалну интеракцију и социјалну меморију, ПАМ и НАМ ефекти на просторну меморију, ПАМ и НАМ ефекти на некогнитивне домene (емоционалност, мотивацију, моторну функцију), ПАМ и НАМ ефекти на експресију *Gabra2*, *Gabra3* и *Gabra5*, ПАМ и НАМ ефекти на неуроинфламацију, као и: Да ли се очекују супротни ефекти селективних ПАМ и НАМ.

Поглавље **Закључак** садржи сажето приказане најважније закључке проистекле из резултата истраживања и њихове анализе, а који су у складу са постављеним циљевима истраживања.

У поглављу **Литература** наведено је 159 референци које су коришћене у докторској дисертацији, цитираних Харвардским стилем.

## **В. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА**

Резултати ове докторске дисертације подељени су у девет целина, у складу са постављеним циљевима истраживања.

У фармакокинетичкој студији је утврђена доза за процену ефеката ПАМ и НАМ у условима продужене примене код *5xFAD* животиња.

Трансгене женке су показале слабију меморију у тесту препознавања новог објекта за процену краткорочне објектне меморије у поређењу са нетрансгеним 6-месечним женкама, пружајући доказ да је модел успео да опонаша смањење објектне меморије. *MP-III-022* није успео да покаже побољшање објектне меморије код трансгених женки и смањено је ову врсту меморије код нетрансгених женки. *5xFAD* трансгени и нетрансгени мужјаци нису правили разлику између нових и старих објекта. Примена *PWZ-029* је побољшала објектну меморију код нетрансгених мужјака, упућујући на когнитивни ефекат зависан од пола.

Код трансгених и нетрансгених *5xFAD* мужјака није била примећена смањена социјална интеракција, али је *PWZ-029* третман нарушио социјалну интеракцију, док *MP-III-022* није имао никакав утицај на социјалну интеракцију ни код трансгених ни код нетрансгених мужјака у овој студији. Социјална меморија је очувана код трансгених и нетрансгених контролних мужјака, док је *MP-III-022* третман индуковао оштећење социјалне меморије код мужјака оба генотипа. *PWZ-029* није имао никакав утицај на социјалну меморију код *5xFAD* мужјака. Социјална интеракција и социјална меморија код *5xFAD* трансгених и нетрансгених женки није била примећена, што би могла бити последица више фактора (еструсни циклус, полни утицаји на експлорацију простора).

Контролне трансгене и нетрансгене животиње показале су подједнако очувану меморију током тренинга у *MWM*-у. *MP-III-022* третман код трансгених женки показао се штетним за учење у фази тренинга *MWM*-а. У првом дану фазе реверзног учења, третман са *MP-III-022* је утицао на трансгене женке да успеју да пронађу нову платформу. Нетрансгени мужјаци који су третирани са *PWZ-029* имали су најкраћу латенцију за проналажење нове платформе у првом дану реверзног тренинга у односу на нетрансгене мужјаке третиране растварачем, упућујући на корисне последице негативне модуларције  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора. У реверзном *probe* тесту, трансгене женке, независно од третмана, показале су веће латенције за проналажење нове платформе у поређењу са старом, што би могло указивати на полно зависну поремећену когнитивну флексибилност. *PWZ-029* третирано нетрансгени мужјаци показали су повећано истраживање старе платформе у односу на контролне нетрансгене мужјаке, што би могао бити показатељ когнитивне истрајности (енг. *cognitive perseverance*). *MP-III-022* третман је довео до повећања периферног времена у *probe* тесту код трансгених женки, што упућује на негативан утицај на процедуралну компоненту стицања меморије (аквизиције).

У овој студији, дошло је до очигледне моторне слабости код контролних трансгених женки. Третман *MP-III-022* је убрзао моторну дисфункцију код трансгених мужјака у поређењу са трансгеном контролом, док примена *PWZ-029* није утицала на моторну функцију у поређењу са одговарајућим трансгеним или нетрансгеним животињама третираним растварачем.

Такође, дошло је до смањења емоционалне реактивности код контролних трансгених мужјака у поређењу са здравом контролом, што би се могло тумачити као смањена анксиозност која кореспондира са дезинхибиторним тенденцијама уоченим код пацијената са *AD*. Код трансгених мужјака, емоционалност је додатно смањена након примене *PWZ-029* у поређењу са трансгеним контролним мужјацима, док су оба лиганда резултовала смањеном емоционалношћу код нетрансгених животиња. С друге стране, ПАМ третман није утицао на емоционалност код трансгених мужјака у поређењу са њиховом патолошком контролом, док је код трансгених женки *MP-III-022* показао тенденцију повећања емоционалности у поређењу са трансгеном контролом, барем у погледу параметра проценат периферног пута. Компонента побуђености у мотивацији није била погођена код контролних трансгених животиња у поређењу са њиховом здравом контролом, док су оба типа модуларције допринела ефекту генотипа да се смањи мотивација код трансгених мужјака, са значајним разликама у поређењу са аналогно третираним нетрансгеним мужјацима.

*Gabra5* нивои у хипокампусу код трансгених у поређењу са нетрансгеним *5xFAD* мужјацима били су снижени. Даље, третман са *PWZ-029* показао је тренд повећања *Gabra5* генске експресије у хипокампусу код трансгених мужјака, али не и код женки мишева, што би могло бити од значаја за когницију. Промене у префронталном нивоу *Gabra5* код пацијената са *AD*, у поређењу са контролом, нису откривене. Експресија гена за *Gabra5* у префронталном кортексу је била непромењена између трансгених и нетрансгених животиња оба пола третираних растварачем. Док *PWZ-029* није деловао, *MP-III-022* је смањио *Gabra5* код нетрансгених женки у поређењу са нетрансгеним женкама третираним растварачем. Резултати су показали дивергентни образац експресије *Gabra2* (смањење) и *Gabra3* (повећање) само у хипокампусу код контролних трансгених женки, што упућује на ефекте зависне од региона и пола. *MP-III-022* и *PWZ-029* вратили су нивое експресије *Gabra2* и *Gabra3* код трансгених женки на нивое здраве контроле. Поред тога, *PWZ-029* је узроковао већу експресију *Gabra2* у префронталном кортексу код трансгених мужјака, као и у хипокампусу код нетрансгених женки.

Повећани нивои *Gfap* иРНК у префронталном кортексу и хипокампусу, уочени код трансгених у поређењу са нетрансгеним мишевима, упућује на астроглиозу. Нивои *Gfap*-а код контролних трансгених мужјака били су виши у поређењу са контролним трансгеним женкама. Примена *PWZ-029* код трансгених мужјака је смањила нивое *Gfap* у поређењу са трансгеним мужјацима третираним растварачем у хипокампусу, док су нивои *Gfap* код нетрансгених женки били повећани у поређењу са онима третираним растварачем. Микроглиоза је показана кроз повећање експресије *Iba-1* у хипокампуса код трансгених животиња третираних растварачем, у поређењу са нетрансгеним животињама; у префронталном кортексу, таква разлика није откривена.

Транскрипти интерлеукин-1 (*Il-1*), интерлеукин-6 (*Il-6*) и фактор некрозе тумора  $\alpha$  (*Tnf- $\alpha$* , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) били су повећани код трансгених животиња у поређењу са нетрансгеним животињама. Примена *PWZ-029* је смањила неуроинфламацију у хипокампусу код трансгених женки у поређењу са њиховом трансгенском контролом. Такође, НАМ је смањио *Gfap* код трансгених мужјака и повећао *Gfap* код нетрансгених женки у поређењу са њиховим контролама у хипокампусу. Супротни ефекти указују на зависност негативне алостерне модулације  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора од пола и генотипа.

## **С. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ**

У оквиру дисертације показано је да смањење краткорочне објектне меморија код трансгених женки пружа доказ да је модел успео да опонаша смањење објектне меморије, што је у складу са претходним резултатима (Creighton и сар., 2019). Подаци за смањење објектне меморија након примене *MP-III-022* код нетрансгених женки су усклађени са резултатима добијеним код пацова, где је *MP-III-022* потиснуо дугорочну меморију за препознавање објеката (Сантрач и сар., 2022а). Слично претходним студијама које су показале да НАМ може побољшати објектну меморију (нпр. Милић и сар., 2013), *PWZ-029* је побољшао објектну меморију код нетрансгених мужјака.

Негативан утицај *PWZ-029* на социјалну интеракцију код *5xFAD* мужјака у делимичном је нескладу са налазима да селективни инверзни или парцијални агонисти  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора нису утицали на социјабилност код *Sprague-Dawley* пацова, док је *ФГ7142*, неселективни инверзни агонист *GABA<sub>A</sub>* рецептора, смањило социјалну интеракцију (Paine и сар., 2020). Такође, иако су просоцијални ефекти показани након стереотаксичне примене мусцимола код пацова (Hu и сар., 2019), *MP-III-022* није имао никакав утицај на социјалну интеракцију трансгених и нетрансгених мужјака у овој студији. Социјална меморија је била очувана код трансгених и нетрансгених контролних мужјака као што је показано у претходним студијама (Kosel и сар., 2021). Примена *MP-III-022* третман је узроковала оштећење социјалне меморије код мужјака оба генотипа. Скорије публиковани резултати су показали смањену социјалну дискриминацију изазвану *MP-III-022* третманом код пацова *Wistar* соја (Сантрач и сар., 2022а). *PWZ-029* није имао никакав утицај на социјалну меморију, што је у складу са истраживањем Paine и сарадника (Paine и сар., 2020). Социјална интеракција и социјална меморија код *5xFAD* трансгених и нетрансгених женки није била очувана, што би могла бити последица више фактора, као што су еструсни циклус (Chari сар., 2020), или полни утицаји на експлорацију простора (Cox и сар., 2011).

Контролне трансгене и нетрансгене животиње показале су подједнако очувану меморију током тренинга у *MWM*-у, као и током пробног теста, као што је раније објављено (Ardestani и сар., 2017). Примена *MP-III-022* код трансгених женки показала се штетном за учење у фази тренинга *MWM*-а, што се могло очекивати за позитивну модулацију  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора (Савић и сар., 2009). У реверзном *probe* тесту, за трансгене женке показана је полно зависна поремећена когнитивна флексибилност, што је претходно публиковано за различите протоколе за реверзни *probe* тест код *5xFAD* животиња (Kim и сар., 2021, O'Leary и сар., 2022). Код трансгених женки, *MP-III-022* третман је довео до повећања периферног времена у *probe* тесту, и стога је вероватно имао негативан утицај на процедуралну компоненту аквизиције, што је у складу са резултатима за позитивну модулацију  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора (Савић и сар., 2009).

У овој студији, дошло је до очигледне моторне слабости код контролних трансгених женки, што би могла бити последица бржег развоја патологије код трансгених женки у односу на трансгене мужјаке (Oakley и сар., 2006). Третман *PWZ-029* није утицао на моторну функцију у поређењу са одговарајућим трансгеним или нетрансгеним животињама третираним растварачем, што је у складу са претходним публикацијама (Zanos и сар., 2017).

У овој студији, дошло је до смањења емоционалне реактивности код контролних трансгених мужјака у поређењу са здравом контролом. Иако је наизглед парадоксалан, овај налаз би се могао тумачити у контексту смањене анксиозности која кореспондира са дезинхибиторним тенденцијама уоченим код пацијената са *AD* (упоредити Jawhar и сар., 2012). Ефекат сличан *PWZ-029* на емоционалност је раније примећен након примене једног НАМ код мишијег модела *AD* са патолошким накупљањем тау протеина (Hu и сар., 2018). С друге стране, ПАМ третман није утицао на емоционалност код трансгених женки. *MP-III-022* показао је неочекивану тенденцију повећања емоционалности у поређењу са трансгеном контролом, што би се делимично могло тумачити утицајима позитивне модулације  $\alpha 5$  *GABA<sub>A</sub>* рецептора на повећање тигмотаксије, као што је примећено у Морисовом воденом лавиринту (Савић и сар., 2009). Није било промене у префронталном

кортексу нивоа експресије *Gabra5* код *5xFAD* животиња, што је у складу са резултатима код пацијената са *AD* (Limon и сар., 2012).

*MP-III-022* је смањило ниво експресије *Gabra5* код нетрансгених женки у префронталном кортексу, што се разликује од резултата добијених код *C57BL6* женки мишева хронично третираних алфа5-селективним ПАМ, а који су били подвргнути хроничном благом непредвидивом стресу (Piantadosi и сар., 2016).

У дисертацији се даље дискутује о смањењу генске експресије *Gabra2* и повећању експресије *Gabra3* у хипокампусу код контролних трансгених женки, што је у складу са претходним студијама (Limon и сар., 2012, Grubman и сар., 2019, Antonell и сар., 2013).

Повећана астроглиоза у префронталном кортексу и хипокампусу је у складу са претходним резултатима (Creighton и сар., 2019). Повећана микроглиоза у хипокампусу код *5xFAD* животињама је транслацијски повезани са налазима са људском микроглијом у *AD* (Rangaraju и сар., 2018). Повећана експресија проинфламаторних цитокина је у складу са претходним резултатима (Silva и сар., 2021, Akyzamaa и сар., 2000, Kitazawa и сар., 2011, Zang и сар., 2013).

## Литература

1. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421. doi: 10.1016/s0197-4580(00)00124-x.
2. Antonell A, Lladó A, Altirriba J, Botta-Orfila T, Balasa M, Fernández M, Ferrer I, Sánchez-Valle R, Molinuevo JL. A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(7):1772-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.026.
3. Ardestani PM, Evans AK, Yi B, Nguyen T, Coutellier L, Shamloo M. Modulation of neuroinflammation and pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease using a biased and selective beta-1 adrenergic receptor partial agonist. *Neuropharmacology*. 2017;116:371-386. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.010.
4. Chari T, Griswold S, Andrews NA, Fagiolini M. The Stage of the Estrus Cycle Is Critical for Interpretation of Female Mouse Social Interaction Behavior. *Front Behav Neurosci*. 2020;14:113. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00113.
5. Cox KH, Rissman EF. Sex differences in juvenile mouse social behavior are influenced by sex chromosomes and social context. *Genes Brain Behav*. 2011;10(4):465-72. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00688.x.
6. Creighton SD, Mendell AL, Palmer D, Kalisch BE, MacLusky NJ, Prado VF, Prado MAM, Winters BD. Dissociable cognitive impairments in two strains of transgenic Alzheimer's disease mice revealed by a battery of object-based tests. *Sci Rep*. 2019;9(1):57. doi: 10.1038/s41598-018-37312-0.



7. Grubman A, Chew G, Ouyang JF, Sun G, Choo XY, McLean C, Simmons RK, Buckberry S, Vargas-Landin DB, Poppe D, Pflueger J, Lister R, Rackham OJL, Petretto E, Polo JM. A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat Neurosci.* 2019;22(12):2087-2097. doi: 10.1038/s41593-019-0539-4.
8. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$  aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012;33(1):196.e29-40. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027.
9. Kim MS, Bang J, Kim BY, Jeon WK. Impaired Cognitive Flexibility Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in the 5XFAD Transgenic Mouse Model of Mixed Dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021;76(7):1169-1178. doi: 10.1093/gerona/glab075.
10. Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal  $\beta$ -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol.* 2011;187(12):6539-49. doi: 10.4049/jimmunol.1100620.
11. Kosel F, Hamilton JS, Harrison SL, Godin V, Franklin TB. Reduced social investigation and increased injurious behavior in transgenic 5xFAD mice. *J Neurosci Res.* 2021;99(1):209-222. doi: 10.1002/jnr.24578.
12. Limon A, Reyes-Ruiz JM, Miledi R. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(25):10071-6. doi: 10.1073/pnas.1204606109.
13. Lyra E Silva NM, Gonçalves RA, Pascoal TA, Lima-Filho RAS, Resende EPF, Vieira ELM, Teixeira AL, de Souza LC, Peny JA, Fortuna JTS, Furigo IC, Hashiguchi D, Miya-Coreixas VS, Clarke JR, Abisambra JF, Longo BM, Donato J Jr, Fraser PE, Rosa-Neto P, Caramelli P, Ferreira ST, De Felice FG. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):251. doi: 10.1038/s41398-021-01349-z.
14. Milić M, Timić T, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, Radulović T, Cook JM, Savić MM. PWZ-029, an inverse agonist selective for  $\alpha$ s GABAA receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res.* 2013;241:206-13. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.016.
15. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006;26(40):10129-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.
16. O'Leary TP, Brown RE. Visuo-spatial learning and memory impairments in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: Effects of age, sex, albinism, and motor impairments. *Genes Brain Behav.* 2022:e12794. doi: 10.1111/gbb.12794.
17. Paine TA, Chang S, Poyle R. Contribution of GABAA receptor subunits to attention and social behavior. *Behav Brain Res.* 2020;378:112261. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112261.

18. Piantadosi SC, French BJ, Poe MM, Timić T, Marković BD, Pabba M, Seney ML, Oh H, Orser BA, Savić MM, Cook JM, Sibille E. Sex-Dependent Anti-Stress Effect of an  $\alpha 5$  Subunit Containing GABAA Receptor Positive Allosteric Modulator. *Front Pharmacol.* 2016;7:446. doi: 10.3389/fphar.2016.00446.
19. Rangaraju S, Dammer EB, Raza SA, Rathakrishnan P, Xiao H, Gao T, Duong DM, Pennington MW, Lah JJ, Seyfried NT, Levey AI. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2018;13(1):24. doi: 10.1186/s13024-018-0254-8.
20. Santrač A, Batinić B, Stamenić TT, Arandelović J, Sharmin D, Knutson DE, Cook JM, Savić MM. Positive modulation of  $\alpha 5$ GABAA receptors leads to dichotomous effects in rats on memory pattern and GABRA5 expression in prefrontal cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 2022a;416:113578. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113578.
21. Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T Sr, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;12(9):1179-93. doi: 10.1017/S1461145709000108.
22. Xu H, Liu L, Tian Y, Wang J, Li J, Zheng J, Zhao H, He M, Xu TL, Duan S, Xu H. A Disinhibitory Microcircuit Mediates Conditioned Social Fear in the Prefrontal Cortex. *Neuron.* 2019;102(3):668-682.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.02.026.
23. Xu NZ, Ernst M, Treven M, Cerne R, Wakulchik M, Li X, Jones TM, Gleason SD, Morrow D, Schkeryantz JM, Rahman MT, Li G, Poe MM, Cook JM, Witkin JM. Negative allosteric modulation of alpha 5-containing GABAA receptors engenders antidepressant-like effects and selectively prevents age-associated hyperactivity in tau-depositing mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2018;235(4):1151-1161. doi: 10.1007/s00213-018-4832-9.
24. Zanos P, Nelson ME, Highland JN, Krimmel SR, Georgiou P, Gould TD, Thompson SM. A Negative Allosteric Modulator for  $\alpha 5$  Subunit-Containing GABA Receptors Exerts a Rapid and Persistent Antidepressant-Like Action without the Side Effects of the NMDA Receptor Antagonist Ketamine in Mice. *eNeuro.* 2017;4(1):ENEURO.0285-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0285-16.2017.
25. Zhang B, Vogelzang A, Miyajima M, Sugiura Y, Wu Y, Chamoto K, Nakano R, Hatae R, Menzies RJ, Sonomura K, Hojo N, Ogawa T, Kobayashi W, Tsutsui Y, Yamamoto S, Maruya M, Narushima S, Suzuki K, Sugiya H, Murakami K, Hashimoto M, Ueno H, Kobayashi T, Ito K, Hirano T, Shiroguchi K, Matsuda F, Suematsu M, Honjo T, Fagarasan S. B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity. *Nature.* 2021;599(7885):471-476. doi: 10.1038/s41586-021-04082-1.

#### **Д. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

##### **Рад објављен у врхунском међународном часопису (M21)**

1. Arandelović J, Santrač A, Batinić B, Todorović L, Stevanović V, Tiruveedhula VVNPB, Sharmin D, Rashid F, Stanojević B, Cook JM, Savić MM. Effects of  $\alpha 5$

GABAA receptor modulation on social interaction, memory and neuroinflammation in mouse model of Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2022. doi: 10.1111/cns.13914. (IF 5,243 за 2020; 55/276 *Pharmacology & Pharmacy*)

**Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22)**

1. Arandjelović J, Santrač A, Batinić B, Todorović L, Ahmed Khan MZ, Rashid F, Poe MM, Obradović A, Cook JM, Savić MM. Positive and negative selective allosteric modulators of  $\alpha 5$  GABAA receptors: effects on emotionality, motivation, and motor function in the 5xFAD model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;84(3):1291-1302. doi: 10.3233/JAD-215079. PMID: 34657887. (IF 4,472 за 2020; 94/273 *Neurosciences*)

**Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34)**

1. Arandjelović J, Santrač A, Batinić B, Stevanović V, Todorović L, Cook J, Savić M. The effects of positive and negative modulators of alpha5 GABAA receptors on social behavior in 5xFAD model of Alzheimer's disease. 33rd ECNP Congress, Vienna, Austria, 12-15.9.2020.
2. Arandjelović J, Santrač A, Batinić B, Cook J, Savić M. Can biderictional modulation of alpha5 GABAA receptors result in biderictional changes of behavior in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease? Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, Belgrade, Serbia, 6-8.12.2019.

**Саопштења на скуповима националног значаја штампана у изводу (M64)**

1. Arandjelović J, Banićević M, Obradović A, Savić M. Behavioral characterization of sociability in the 5xFAD transgenic animal model of Alzheimer disease. VII Serbian congress of Pharmacy, Belgrade, Serbia, 10-14.10.2018.

**D. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Резултати ове докторске дисертације су дали значајан увид о ПАМ и НАМ модулатији  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> рецептора код 5xFAD животиња, што до сада није било урађено. Поред тога, спроведено је опсежно тестирање и потврђена валидност 5xFAD модела AD. Најбитније, дисертација је указала на изостанак генерализованих корисних ефеката на понашање тестираних ПАМ и НАМ у раном периоду AD у наведеном експерименталном дизајну. Постојање ефеката НАМ на смањење неуроинфламације у AD која доприноси патогенези болести упућује на клинички потенцијал ових лиганата, и да би истраживања требало наставити.

## **Е. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ**

На основу прегледа докторске дисертације маг. фарм.- мед. биохем. Јоване Аранђеловић под називом „**Бимодална модулација алфа5 GABA<sub>A</sub> рецептора у експерименталном моделу Алцхајмерове болести**“ може се закључити да је кандидат испунио постављене циљеве и да резултати приказани у дисертацији представљају оригиналан и значајан научни допринос, што је потврђено њиховим објављивањем у облику по једног рада у врхунском и истакнутом међународном часопису, чији збир импакт фактора за 2020. годину износи 9,715.

Комисија, стога, предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и након добијања сагласности Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду одобри маг. фарм.- мед. биохем. Јовани Аранђеловић јавну одбрану докторске дисертације.

**Београд, 05.07.2022.**

### **Чланови Комисије:**

---

Др Бојан Батинић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет, председник

---

Др Лидија Тодоровић, научни сарадник,  
Универзитет у Београду – Лабораторија за радиобиологију и молекуларну генетику,  
Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију

---

Др Александар Трбовић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Медицински факултет