

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА**

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Иване Д. Перић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 14.12.2017. године, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Иване Д. Перић, мастер биохемичара, стручног саветника Института за нуклеарне науке „Винча“ - Института од националног значаја за Републику Србију, при Универзитету у Београду, под називом:

### **„Протеомски и метаболомски увид у биохемијске основе депресије и деловање антидепресива на животињском моделу депресије“**

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној дана 21.12.2017. године, на захтев Хемијског факултета (евиденциони број: **1199/5** од 14.12.2017. године), дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број **61206-5263/2-17**). Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научног већу подноси следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Иване Перић написана је на 195 стране А4 формата, фонт 12, проред 1,5 и садржи 61 слику и 21 табелу. Докторска дисертација је подељена на 8 поглавља: **Увод** (3 стране), **Теоријски део** (39 страна), **Циљеви** (2 стране), **Материјал и методе** (17 страна), **Резултати** (49 страна), **Дискусија** (30 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (34 стране, 416 цитата). Поред наведеног, дисертација садржи Насловне стране на српском и енглеском језику, једну страну са именима ментора и чланова комисије, Захвалницу (1 страна), Сажетак на српском и енглеском језику (по 3 стране), Списак скраћеница и акронима (4 стране), Садржај (3 стране), Биографију кандидата (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истовестности (1 страна) и Изјаву о коришћењу (1 страна).

У **уводном делу** дисертације кандидаткиња указује на проблем непотпуног познавања биохемијске основе депресије, као све присутнијег поремећаја понашања код људи. Истакнут је ризик излагања психосоцијалном стресу, као што је хронична изложеност стресу социјалне изолације, на настанак депресије, што је узето као хипотеза за употребу валидираног животињског модела хроничне социјалне изолације у оквиру експерименталног дела дисертације. Наглашена је и осетљивост можданог региона хипокампуса, у структурном и функциоалном погледу, у условима изложености стресу. Такође, кандидаткиња наводи и проблем мање ефикасног деловања антидепресива, услед непотпуног увида у молекулске механизме њиховог деловања. Даље, кандидаткиња наводи да је применом метода протеомске и метаболомске анализе хипокампуса мужјака пацова

соја „Wistar” испитала измењене биохемијске путеве, у циљу идентификације кључних молекулских мета социјалне изолације (у трајању од 6 недеља) код пацова, која изазива понашање налик депресивном, као и могућности ефикасног третмана антидепресивима супротног основног механизма деловања, тианептина или флуоксетина (3 недеље). На крају, кандидаткиња истиче да би идентификовање циљаних молекула депресије и заједничког механизма деловања антидепресива дало допринос ефикаснијем третману, у смислу креирања нових лекова циљаног механизма деловања.

У **теоријском делу** дат је увид у разумевање депресије кроз историју, са посебним освртом на природу њених етиолошких фактора. Кандидаткиња је објаснила значај оптималног функционисања одговора на стрес у организму, али и штетност коју изазива поремећај алоустатских механизма у условима продужене изложености стресу. Дат је и детаљнији приказ биолошких фактора депресије, на основу, до сада, идентификованих патобиохемијских промена, и, на примеру истих, наведене су постојеће теорије депресије. Објашњена је структурно-функционална осетљивост хипокампуса на стрес, уз приказ динамике биохемијских процеса и значаја специфичне међућелијске комуникације између неурона и ћелија глије у овом možданом региону. Концепт животињског модела депресије, који је предмет изучавања ове дисертације, објашњен је кроз критеријуме за његову валидацију: наведени литературни подаци сведоче о квалитетима модела хроничне социјалне изолације, као животињског модела за истраживање депресије. Кандидаткиња потом наводи терапеутске приступе код третмана депресије, где наглашава фармакотерапију и постојање различитих класа антидепресива и њихових основних механизма деловања. У посебним целинама овог поглавља, дат је и приказ функционалних аспеката деловања тианептина и флуоксетина, уз навођење молекулских промена које се повезују са утицајем њихове хроничне примене. Даље, кандидаткиња описује савремени концепт „омикс“ технологија и њихов растући значај у истраживању болести. Објашњен је појам протеомикса, са освртом на различите приступе анализе добијених података, попут нетаргетованог и таргетованог приступа, или „bottom-up” и “bottom-down” протеомикса. Такође, кандидаткиња описује савремени концепт свеобухватне метаболомске анализе, указујући на растући тренд њене примене у сврху откривања биохемијских дерегулација, као и биомаркера депресије и успешности третмана. Наведене су различите методе метаболомске анализе, а посебно је објашњена примена гасне хроматографије, са акцентом на дводимензионалну гасну хроматографију, као савремен приступ раздвајања метаболита. Као код протеомске анализе, истакнут је значај нетаргетованог приступа и добијања велике количине података који осликавају тренутку биохемијску кинетику ћелија/ткива. Кроз литературни приказ досадашње примене метаболомске анализе, кандидаткиња истиче значај овог методолошког приступа као самосталне методе, или као допуне другим „омикс“ методама, у форми „интерактомикса“. На крају поглавља, кандидаткиња даје увид у савремене, мултиваријантне анализе велике количине података добијене нетаргетованим „омикс“ приступом, и наглашава потенцијал класификатора заснованог на принципу машинског учења у анализи добијених података.

У експерименталном делу најпре су приказане процедуре и услови рада са животињама, уз детаљан опис коришћеног животињског модела. У склопу третмана животиња, описана је припрема раствора лекова и динамика третмана. За одређивање понашања налик депресивном и/или анксиозном, као и, на основу њих, одабира животиња, коришћени су тестови понашања чије процедуре извођења кандидаткиња даје у посебним целинама. Такође, дат је детаљан опис изоловања ћелијских фракција ткива хипокампуса пацова за LC-MS/MS протеомску анализу. Кандидаткиња је дала детаљан опис коришћених техника: одређивање концентрације протеина према Lowry-ју, „Western blot“, имунохистохемијске и имунофлуоресцентне анализе, наводећи списак свих коришћених антитела. Наведена је детаљна процедура припреме узорака мешавином водене и органске фазе, дериватизације и других услова извођења GC×GC-MS анализе. На крају, кандидаткиња наводи методе примењене за статистичку обраду резултата тестова понашања и података молекулских анализа, као и за обраду резултата метаболомске анализе, која се базира на мултиваријантној обради и примени класификатора заснованих на алгоритмима машинског учења.

У поглављу **Резултати** дат је приказ података добијених током израде ове докторске дисертације. У првој целини, кандидаткиња прилаже резултате тестова понашања животиња: тест сахарозне преференције, тест закопавања кликера и тест принудног пливања. За резултате сахарозног теста и теста закопавања кликера код групе животиња третираних флуоксетином, кандидаткиња се позива на раније објављени рад. Наредна целина приказује резултате „Western blot“ анализе, у смислу провере релативне чистоће фракција хипокампуса изолованих за протеомску анализу. Посебну целину чине резултати протеомске анализе цитосола и несинаптичких митохондрија, табеларно приказани. Ове табеле прате слике које приказују биоинформатичку обраду података, помоћу „Blast2GO“ и/или „String“ платформи, што даје биолошки значај уоченим интеракцијама између дерегулисаних протеина. Изабране протеинске промене проверене су помоћу „Western blot“ анализе, или имунохемијским методама, чији резултати су приказани на сликама испод одговарајућих резултата протеомске анализе. У издвојеној целини, кандидаткиња је дала табеларни приказ значајних промена метаболита добијених за пет међугрупних поређења. На сликама су приказани „PLS-DA“ дводимензионални графички прикази за међугрупна поређења. На крају, дат је и табеларни приказ и корелационе анализе између резултата метаболомске студије и имобилног понашања одговарајућих група животиња, како би се утврдила повезаност одређених метаболита у овој врсти понашања, које корелира са понашањем налик депресивном код пацова.

Поглавље **Дискусија** подељено је на четири тематске целине, конципиране према врсти стресора, односно ефеката испитаних третмана. У првој целини, кандидаткиња је продискутовала уочене протеомске и метаболомске промене код животиња изложених стресу социјалне изолације. У другој целини, дискутовани су резултати уочених промена након третмана флуоксетином код контролних и стресираних животиња, док је трећу целину кандидаткиња посветила дискусији протеомских и метаболомских промена

изазваних хроничним третманом тианептином. Свака целина садржи слику која сумира уочене промене на молекулском нивоу. Последња (четврта) целина је посвећена молекулским променама нађеним код свих испитиваних група животиња, које су, у форми табеларног приказа, дате за цитосолну фракцију и фракцију несинаптичких митохондрија. Приказани су и графички прикази промена у нивоу ГАБА-е, пироглутамата, кетамина, норкетамина и ксилазина између свих испитиваних група.

У **Закључку** је кандидаткиња таксативно приказала закључке добијене на основу анализе и дискусије свих добијених резултата у оквиру своје докторске дисертације.

**Литература** садржи 419 литературних навода, приказаних редоследом навођења у тексту дисертације.

## **Б. Кратак приказ резултата**

Да би испунила циљеве постављене у овој докторској дисертацији, кандидаткиња је прво припремила животињске узорке хипокампуса експерименталних група, изводећи процедуру животињског модела социјалне изолације (6 недеља) и/или хроничног третмана антидепресивима (3 недеље). Извођење тестова понашања омогућило је одабир животиња код којих је стрес социјалне изолације изазвао понашање налик депресивном (анхедонија и стања очаја) или анксиозност, а третман антидепресивима показао ефикасност у нормализацији понашања. Хронични стрес је код пацова изазвао пад склоности ка сахарози, раст броја закопаних кликера, као и имобилног понашања у тесту принудног пливања, док је ефикасан третман антидепресивима вратио ове параметре на првобитно стање. Узорке хипокампуса кандидаткиња је припремила према протоколу изоловања фракција за извођење протеомске анализе; њихова чистоћа је одређена „Western blot“ методом. Испитивањем дистрибуције специфично локализованих протеина, кандидаткиња је потврдила релативну чистоћу фракција, показујући доминантно присуство  $\alpha$ -тубулина у цитосолној фракцији, ТАТА-везујућег протеина у једарној фракцији, цитохром ц-оксидазе IV у фракцији несинаптичких митохондрија и синаптофизина у синаптозомалној фракцији. Као позитивна контрола наношења узорака, урађена је детекција  $\beta$ -актина, која је била најзаступљенија у цитосолној и нуклеосолној фракцији.

Кандидаткиња је биоинформатички обрадила резултате диференцијалне протеомске анализе цитосолне и фракције обogaћене несинаптичким митохондријама између експерименталних група. У цитосолној фракцији, стрес социјалне изолације углавном је деловао смањењем експресије детектованих протеина. Стресом-измењени протеини углавном су укључени у регулацију организације микротубула цитоскелета и негативну регулацију њихове полимеризације, као и у склапање протеинских комплекса. „STRING“ интерактомиксом је потврђена негативна регулација де/полимеризације микротубула услед повећања експресије релевантних протеина. Хроничним третманом тианептина је у цитосолу контролних животиња уочен повећан број интеракција између протеина увећане експресије, пре свега протеина који учествују у транспорту посредованом протеинима и везикулама, као и у протеолизи укљученој у ћелијски катаболизам. Код социјално

изолованих животиња, тианептин је примарно деловао смањењем експресије протеина који су укључени у везикуларни транспорт, протеолизу и оксидо-редукционе процесе. Код четири протеина су детектоване промене у виду повећања експресије. Конкретно, помоћу „Western blot“ анализе, потврђено је повећање експресије CuZnSOD и смањење експресије GAPDH и  $\alpha$ -субјединице типа 3 протеазома, након ефикасног третмана тианептином, као и повећање нивоа калбиндина код контрола третираних тианептином, што је потврђено и у дорзалном хипокампусу, квалитативном имунохистохемијском методом. Флуоксетин је у цитосолу контролних животиња смањив експресију протеина укључених у организацију ћелијских компонената, према „Blast2GO“ анализи. Повећана експресија протеина подстакла је процесе дуготрајне стимулације нервних ћелија, синаптичке пластичности и регулације нивоа неуротрансмитера, према „STRING“ анализи. Методом „Western blot-a“, потврђено је повећање нивоа калретинина након третмана флуоксетином у контролним животињама. У цитосолу стресираних животиња, флуоксетин је доминантно утицао на смањење експресије протеина укључених у метаболичке процесе, регулацију сигналних процеса и организацију ћелијских компонената, према „Blast2GO“, односно, катаболичке процесе органа-нитратних једињења, према „STRING“-у. Протеини повећане експресије били су протеини укључени у процес ћелијске комуникације, организације органела и протеински транспорт. Имунофлуоресцентном методом је потврђен повећан ниво HSP90 протеина само код стресираних животиња, и то у дентатном гирусу и CA3 субрегиону хипокампуса, без утицаја флуоксетина. Квалитативно је, имунохистохемијском методом, показано повећање експресије HSP60, МаоА и PDH E1 $\alpha$  након третмана флуоксетином код стресираних животиња, пре свега у дентатном гирусу и CA3 субрегиону.

У фракцији обогаћеној несинаптичким митохондријама, уочен је израженији реверзибилни ефекат деловања антидепресива. Стрес социјалне изолације је углавном изазвао смањење експресије протеина у овој фракцији, и то протеина укључених у транспорт, оксидо-редукционе процесе, као и стварање метаболита енергетских процеса. Анализом интеракција према STRING-у, социјална изолација ремети процесе транспорта и оксидативне фосфорилације у несинаптичким митохондријама. Супротно томе, третман тианептином је, и код контролних и код стресираних животиња, повећао укупну експресију протеина, стимулишући процесе АТФ-метаболизма и транспорта јона. Методом „Western blot-a“, потврђено је повећање АТФ5 $\alpha$  субјединице и у условима стреса и након третмана тианептином, док је транспортер VDAC1 повећан искључиво након ефикасног третмана тианептином. Као у случају тианептина, флуоксетин је повећао експресију протеина у несинаптичким митохондријама који су, према „Blast2GO“, пре свега укључени у метаболичке процесе, организацију ћелијских компонената и сигнализацију, а према STRING-у у Кребсов циклус и митохондријални транспорт.

Кандидаткиња је успоставила протокол екстраховања и дериватизовања метаболита хипокампуса, чији је садржај, након раздвајања свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом, одређен масеном спектрометријом. Идентификован је спектар интерног стандарда, деутерисаног аланина, који је искоришћен у нормализацији појединачних

анализа. Идентификовано је укупно 15 значајно измењених метаболита у хипокампусу стресираних животиња, у највећем броју смањене концентрације. Социјална изолација је повећала ниво четири метаболита, и то масних киселина, док је смањење нивоа уочено код шећера глукозе и алофуранозе, аминокиселина глицина и пироглутамата, као и на нивоу ГАБА неуротрансмитера,  $\alpha$ -кетобутерне киселине, али и фосфат-монометил естра. Узорке животиња, које показују понашање налик депресивном, било је могуће класификовати на основу мултиваријантне „PLS-DA“ базиране на пет компоненти, као и уз помоћ класификатора „случајне шуме“ (енгл. Random forest, RF) уз оптималне перформансе и ООБ грешку од свега 0,08. Овом анализом, као главне променљиве које доприносе класификацији, истакли су се ГАБА, етил-изоалохолат,  $\alpha$ -кетобутерна и октадеценска киселина. У овој дисертацију је по први пут одређен образац метаболомских промена у хипокампусу социјално изолованих животиња које показују понашање налик депресивном.

Третман тианептином је, на метаболомском нивоу, нормализовао већину измењених метаболита хипокампуса код стресираних животиња, са уоченом значајношћу за глицин, пироглутамат, ГАБА неуротрансмитер и октадеценску киселину. Поред тога, тианептин је значајно повећао нивое треонина, аспарагинске киселине, пантотенске киселине, холестерола, докозацидидиоичне киселине, арахидонске киселине, креатинина, N-ацетил глукозамина, сукцината и лимунске киселине. Према „PLS-DA“, метаболомске разлике изазване деловањем тианептина код стресираних група су израженије у односу на контролну групу животиња. Главне променљиве, које доприносе разликама метаболомских профила, су транс-13-октадеценска киселина, *мио*-инозитол, холестан-3,5-диол 5-ацетат и пантотенска киселина. Овај резултат потврђује и „RF“ класификатор, који даје значајно нижу грешку груписања код тианептином третираних социјално изолованих животиња.

Хронични третман флуоксетином је показао значајне измене код мањег броја метаболита у односу на третман тианептином. Флуоксетин је, слично тианептину, смањив ниво *мио*-инозитола код контролних животиња, али и показао тренд нормализације глукозе, метил-гликохолата, монометил естра фосфорне киселине, пироглутамата и  $\alpha$ -кетобутерне киселине. Такође, флуоксетин је значајно повећао ниво L-норвалина у хипокампусу стресираних животиња. Предиктивна вредност класификатора хроничног третмана флуоксетином слична је оној код тианептина, са ООБ грешком „RF“ класификатора од 0,10, уз најзначајнији допринос глицерола, глукозе и малата; код контролних животиња, услед недовољних метаболомских разлика, класификација није могућа, што потврђује и висока ООБ грешка (0,917).

Оба антидепресива су показала заједнички ефекат значајног повећања, или тренда повећања, нивоа кетамина и ксилазина у хипокампусу контролних и стресираних животиња. Након третмана тианептином, повећање кетамина праћено је и повећањем његовог главног метаболита норкетамина, што није случај код третмана флуоксетином. Као узрок уоченог налаза, кандидаткиња наводи окупираност П450 ензимског система који разлаже кетамин, а уједно је код животиња третираних флуоксетином задужен и за метаболизам лека.

Пирсоновом корелационом анализом, показана је могућа међузависност више метаболита и имобилног понашања: највећа позитивна корелација постоји са нивоом миоинозитола и стеаринске киселине, док је највећа негативна корелација уочена са нивоом докозахексаеноичне киселине, галактозе, пидолне киселине, и простагландина Д<sub>2</sub>, чија је негативна корелација са депресивним понашањем и раније документована. Такође, садржај ГАБА, која се истиче као једна од најзначајнијих променљивих које доприносе класификацији животиња са понашањем налик депресивном у односу на контролне, показује значајну негативну корелацију са имобилношћу животиња, поткрепљујући могући значај овог неуротрансмitera у патобиохемији депресивног понашања.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе**

Кандидаткиња је у оквиру своје докторске дисертације дала увид у свеобухватне протеомске и метаболомске промене у хипокампусу животиња које показују понашање налик депресивном, изазвано стресом социјалне изолације, као и промена изазваних хроничним третманом са два антидепресива супротног основног механизма деловања, тианептина и флуоксетина, код контрола и социјално изолованих животиња. Биоинформатичком обрадом података, кандидаткиња је указала на виши, биохемијски, значај појединачних промена у експресији протеина. Социјална изолација је, као психосоцијална парадигма истраживања депресије, предмет изучавања дуго низ година. Депресија је деценијама испитивана болест, посебно применом транслационог приступа. Према нашим сазнањима, не постоје подаци о свеобухватној карактеризацији протеома на нивоу цитосола и несинаптичких митохондрија, као и метаболома у хипокампусу, изазвани као последица хроничне изложеност стресу социјалне изолације (6 недеља) и хроничног антидепресивног деловања (3 недеље). Први пут је урађена нетаргетована метаболомска карактеризација хипокампуса животиња изложених стресу социјалне изолације и/или након деловања антидепресива, применом дводимензионалне гасне хроматографије. Подаци који сведоче о корелацији метаболита у хипокампусу са имобилним понашањем животиња дају нови увид у биохемијско-фенотипску карактеризацију понашања налик депресивном.

Протеомске студије извођене су на другим животињским моделима депресије, углавном на моделу благог непредвидивог стреса (**Bisgaard et al., 2012**). Као у овом литературном наводу, овом дисертацијом је код антидепресивног деловања флуоксетина и тианептина препознат значај регулаторног протеина Rab GDP дисоцијациони инхибитор  $\alpha$ . Преклиничке протеомске анализе мозга, на различитим моделима депресије, указале су на поремећај енергетског метаболизма (**Marais et al., 2009; Tang et al., 2019**). Међутим, до данас нису познате специфичне протеинске мете депресивног понашања. Приложена дисертације је, сагласно резултатима за друге анималне моделе депресије, значај молекулских промена током стреса и деловања антидепресива везала за енергетски метаболизам несинаптичких митохондрија у хипокампусу социјално изолованих пацова. Резултати ове дисертације по први пут дају увид у измене суб-протеома хипокампуса код стреса социјалне изолације и, заједно са доступним литературним подацима, дају допринос

у интерпретацији измењених биохемијских, посебно енергетских, процеса код хроничне социјалне изолације.

Примена метаболомске анализе у истраживању болести је нов методолошки приступ изучавања. Ограничен број радова се на овај начин бавио депресијом. Таргетовани метаболомски приступи су указали на везу између стреса и метаболизма масних киселина (Zhao et al., 2019). На примеру хроничног непредвидивог стреса, истакнут је потенцијал ГАБА неуротрансмитера као биомаркера стреса (Akimoto et al., 2019), што је у сагласности са резултатима ове докторске дисертације. Доступни подаци о метаболомским променама малог мозга, код благог непредвидивог стреса, указују на поремећаје енергетског метаболизма и глицина (Shao et al., 2013, 2015). Метаболомском анализом вентралног хипокампуса уочена је веза између осетљивости животиња на стрес, динамике митохондрија која фаворизује процесе митохондријалне фузије (спајања) с циљем неутралисања реактивних кисеоничних врста, а на рачун енергетских процеса (Brivio et al., 2022). До сада нема података о метаболомским променама хипокампуса на примеру стреса социјалне изолације. Примена комбиноване протеомске и метаболомске анализе даје могућност детаљније анализе уочених промена у испитиваним регионима мозга. Овим приступом је, у студији урађеној на малом мозгу и хипокампусу код хроничног непредвидивог благог стреса, утврђен поремећај енергетског метаболизма, метаболизма аминокиселина, дерегулација метаболизма глутамата и глицина, као и метаболизма масних киселина (Shao et al., 2015; Zhang et al., 2018), све у складу са резултатима ове дисертације.

Циљана метаболомска анализа, на примеру испитивања деловања антидепресива пароксетина, сугерише на посебан значај *мио*-инозитола у хипокампусу мишева као биомаркера антидепресивног деловања (Webhofer et al., 2013). Резултати ове дисертације такође истичу значај *мио*-инозитолног сигналног пута у антидепресивном деловању тианептина и флуоксетина и, по први пут, указују на значајну позитивну корелацију између садржаја *мио*-инозитола и имобилног понашања налик депресивном на моделу социјалне изолације.

Прегледом доступне литературе установљено је да за истраживање понашања налик депресивном, које је изазвано стресом хроничне социјалне изолације, до сада није коришћен комбиновани приступом „омикс“ технологија. Стога, резултати ове докторске дисертације по први пута: а) дају свеобухватни увид у протеомске и метаболомске промене хипокампуса на примењеном животињском моделу социјалне изолације; б) идентификују метаболите повезане са имобилношћу животиња као фенотипском одредницом понашања налик депресивном; в) мапирају кључне молекуле ефикасног антидепресивног деловања тианептина и флуоксетина, на овом моделу депресије.

## Литература:

Akimoto, H., Oshima, S., Sugiyama, T., Negishi, A., Nemoto, T., Kobayashi, D., 2019. Changes in brain metabolites related to stress resilience: Metabolomic analysis of the hippocampus in a rat model of depression. *Behav. Brain Res.* 359, 342–352. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2018.11.017>



- Bisgaard, C.F., Bak, S., Christensen, T., Jensen, O.N., Enghild, J.J., Wiborg, O., 2012. Vesicular signalling and immune modulation as hedonic fingerprints: Proteomic profiling in the chronic mild stress depression model. *J. Psychopharmacol.* 26, 1569–1583. <https://doi.org/10.1177/0269881112460110>
- Brivio, P., Audano, M., Gallo, M.T., Gruca, P., Lason, M., Litwa, E., Fumagalli, F., Papp, M., Mitro, N., Calabrese, F., 2022. Metabolomic signature and mitochondrial dynamics outline the difference between vulnerability and resilience to chronic stress. *Transl. Psychiatry* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01856-7>
- Marais, L., Hattingh, S., Stein, D., Daniels, W., 2009. A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. *Metab. Brain Dis.* 24, 569–586. <https://doi.org/10.1007/S11011-009-9156-3>
- Shao, W.-H., Fan, S.-H., Lei, Y., Yao, G.-E., Chen, J.-J., Zhou, J., Xu, H.-B., Liu, H.-P., Wu, B., Zheng, P., Fang, L., Xie, P., 2013. Metabolomic identification of molecular changes associated with stress resilience in the chronic mild stress rat model of depression. *Metabolomics* 9, 433–443. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0460-2>
- Shao, W., Chen, J.-J., Fan, S.-H., Lei, Y., Xu, H., Zhou, J., Cheng, P.-F., Yang, Y., Rao, C., Wu, B., Liu, H., Xie, P., 2015. Combined Metabolomics and Proteomics Analysis of Major Depression in an Animal Model: Perturbed Energy Metabolism in the Chronic Mild Stressed Rat Cerebellum. *OMICS* 19, 383–92. <https://doi.org/10.1089/omi.2014.0164>
- Tang, M., Huang, H., Li, S., Zhou, M., Liu, Z., Huang, R., Liao, W., Xie, P., Zhou, J., 2019. Hippocampal proteomic changes of susceptibility and resilience to depression or anxiety in a rat model of chronic mild stress. *Transl. Psychiatry* 9, 12. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0605-4>
- Webhofer, C., Gormanns, P., Reckow, S., Lebar, M., Maccarrone, G., Ludwig, T., Pütz, B., Asara, J.M., Holsboer, F., Sillaber, I., Zieglgänsberger, W., Turck, C.W., 2013. Proteomic and metabolomic profiling reveals time-dependent changes in hippocampal metabolism upon paroxetine treatment and biomarker candidates. *J. Psychiatr. Res.* 47, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.11.003>
- Zhang, Y., Yuan, S., Pu, J., Yang, L., Zhou, X., Liu, L., Jiang, X., 2018. N EUROSCIENCE Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis of Hippocampus in a Rat Model of Depression. *Neuroscience* 371, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.12.001>
- Zhao, J., Jung, Y.-H., Jin, Y., Kang, S., Jang, C.-G., Lee, J., 2019. A comprehensive metabolomics investigation of hippocampus, serum, and feces affected by chronic fluoxetine treatment using the chronic unpredictable mild stress mouse model of depression. *Sci. Rep.* 9, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44052-2>

### **Г. Објављени радови и саопштења која чине део докторске дисертације**

Из резултата ове докторске дисертације до сада су проистекла четири научна рада, по један публикован у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и врхунском часопису међународног значаја (M21), затим, два у истакнутим часописима међународног значаја (M22), као и три саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34).

**Рад објављен у међународном часопису изузетних вредности (M21a):**

1. **Perić I**, Costina V, Stanisavljević A, Findeisen P, Filipović D. Proteomic characterization of hippocampus of chronically socially isolated rats treated with fluoxetine: depression-like behavior and fluoxetine mechanism of action. *Neuropharmacology*, 2018, 135 (2018): 268-283. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.03.034, IF<sub>2016</sub> = 5.012.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0028390818301461?via%3Dihub>

**Рад објављен у врхунском часопису међународног значаја (M21):**

1. **Perić I**, Lješević M, Beškoski V, Nikolić M, Filipović D. Metabolomic profiling relates tianeptine effectiveness with hippocampal GABA, *myo*-inositol, cholesterol, and fatty acid metabolism restoration in socially isolated rats. *Psychopharmacology*, 2022, DOI: 10.1007/s00213-022-06180-y, IF<sub>2020</sub>=4.530.

**Радови објављени у истакнутим часописима међународног значаја (M22):**

1. Filipović D, Costina V, **Perić I**, Stanisavljević A, Findeisen P. Chronic fluoxetine treatment directs energy metabolism towards the citric acid cycle and oxidative phosphorylation in rat hippocampal nonsynaptic mitochondria. *Brain Res*, 2017, 1659(4): 41-54. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.01.025, IF<sub>2016</sub> = 2.746.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899317300185?via%3Dihub>
2. **Perić I**, Costina V, Findeisen P, Gass P, Filipović D. Tianeptine enhances energy-related processes in the hippocampal non-synaptic mitochondria in a rat model of depression. *Neuroscience*, 2020, 451: 111-125, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.09.061, IF<sub>2020</sub>=3.590.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452220306497?via%3Dihub>

**Радови саопштени на међународним скуповима штампани у изводу (M34):**

1. **Perić I**, Filipović D, Costina V, Findeisen P. Chronic Treatment with Fluoxetine Led to Alterations in the Rat Hippocampal Proteome. *Belgrade Bioinformatics Conference 2016*, Belgrade, Book of Abstracts, 2016, 128.
2. **Perić I**, Stanisavljević A, Filipović D. Tianeptine: the proteomic insight in molecular effects of its prolonged use as a nootropic. 2<sup>nd</sup> Symposium in Biomedicine: Basic and Clinical Neuroscience, Belgrade, Abstract book, 2019, 8.
3. **Perić I**, Stanisavljević A, Filipović D. The effect of Tianeptine on hippocampal cytosolic and non-synaptic mitochondria sub-proteomes in socially isolated rats. *FENS Regional Meeting 2019*, Abstract Book, 2019, 496.

Поред наведених радова и саопштења који су проистекли из ове докторске дисертације, кандидаткиња је коаутор на још једанаест научних радова категорија M21 (4 рада) и M22 (7 радова), од којих на пет као први аутор, као и три саопштења штампана у целини (M33) и четири саопштења штампана у изводу (M34) на међународним скуповима.

#### **Д. Провера оригиналности докторске дисертације**

Оригиналост докторске дисертације је процењена на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да количина подударања текста износи 11%. Од тога, 2% преклапања уочено је са страницом fedorabg.bg.ac.rs, и односи се на преклапање општих појмова. Преклапање од 1% са докторском дисертацијом др Невене Тодоровић, под називом: „Ефекти флуоксетина и клозапина на антиоксидативни систем и параметре инфламације у мозгу и јетри пацова у условима хроничне изолације“, последица је употребе личних имена, афилијација, сличног модел система и примењених метода, коришћења истог лека, као и сличне области изучавања у обе дисертације. Преклапања са свим осталим изворима мања су од 1% и произилазе, углавном, као последица навођења општих појмова у вези са темом докторске дисертације, као и из навођења цитата, личних имена, звања и биографских података. Сва наведена преклапања су у складу са чланом 9 Правилника. На основу резултата процене, Комисија сматра да Извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те прописани поступак припреме за њену одбрану може да се настави.

#### **Ђ. Закључак**

Комисија је, на основу детаљног прегледа докторске дисертације докторанда Иване Перић, мастер биохемичара, под насловом: „Протеомски и метаболомски увид у биохемијске основе депресије и деловање антидепресива на животињском моделу депресије“, закључила да је кандидаткиња добрим дефинисањем теме докторске дисертације и савременим методолошким приступом решавања постављеног проблема, као и применом савремених метода анализе добијених података, успешно реализовала све постављене циљеве докторске дисертације.

Докторска дисертација Иване Перић дала је свеобухватни увид у протеомске и метаболомске промене на животињском моделу депресије што, захваљујући транслационом истраживачком приступу, усмерава будућа испитивања депресије ка конкретним сигналним путевима и биохемијским процесима на нивоу хипокампуса. Кандидаткиња је први пут указала на скуп најзначајнијих метаболита хипокампуса чија дерегулација дефинише метаболомски образац понашања налик депресивном услед хроничне изложености стресу социјалне изолације, као и након ефикасног деловања антидепресива (тианептина и флуоксетина). Кроз неколико нивоа резултата протеомске анализе, метаболомске анализе, као и биохемијско-фенотипском корелацијом података, кандидаткиња је омогућила увид у најзначајније ћелијске промене у хипокампусу пацова, што ће значајно допринети будућим истраживањима на пољу депресије. Теоријском анализом добијених резултата, као и разматрањем заједничких промена након ефикасног деловања два антидепресива супротног основног механизма деловања, пружен је увид у могућа заједничка места деловања различитих класа антидепресива. Дефинисање

јединствених мета деловања омогућило би дизајнирање лекова повећане ефикасности, а са мањим бројем нежељених ефеката.

Резултати проистекли из ове докторске дисертације до сада су објављени у четири научно-истраживачка рада, и то: један у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и један у врхунском часопису међународног значаја (M21) на којима је кандидаткиња први аутор, два рада објављена у истакнутим часописима међународног значаја (M22), од којих је на једном кандидаткиња први аутор, као и три саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34), на којима је кандидаткиња први аутор.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Иване Перић под насловом: **„Протеомски и метаболомски увид у биохемијске основе депресије и деловање антидепресива на животињском моделу депресије“** прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктор биохемијских наука.

У Београду, 01.07.2022. године

Комисија:

---

др Милан Николић, ванредни професор, ментор  
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

---

др Драгана Филиповић, научни саветник, ментор  
Институт за нуклеарне науке Винча – институт од националног значаја  
Универзитет у Београду

---

др Владимир Бешкоски, редовни професор, члан комисије  
Универзитет у Београду – Хемијски Факултет

**др Милан Николић, ванредни професор (Универзитет у Београду -  
Хемијски факултет)**

1. Radibratović M, Minić SL, Stanić-Vučinić D, Nikolić M, Milčić M, Ćirković Veličković T. Stabilization of Human Serum Albumin by the Binding of Phycocyanobilin, a Bioactive Chromophore of Blue-Green Alga Spirulina: Molecular Dynamics and Experimental Study. PLoS One (2016), 11(12):e0167973.
2. Nikolić-Kokić A, Mijušković A, Tatalović N, Nestorov J, Miler M, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić M, Milošević V, Blagojević D, Spasić M, Miljević Č. Effects of antipsychotic drug administration on antioxidative defense enzymes in male rat kidney. J Toxicol Environ Health A. (2016), 79(20):905-11.
3. Dragana Stanić-Vučinić, Ivana Prodić, Danijela Apostolović, Milan Nikolić, Tanja Ćirković Veličković. Structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions. Food Chemistry (2013), 138:590-599.
4. Čedo Miljević, Aleksandra Nikolić-Kokić, Milan Nikolić, Vesna Niketić, Mihajlo B. Spasić, Dušica Lečić-Toševski, Duško Blagojević. Effect of atypical antipsychotics on antioxidant enzyme activities in human erythrocytes (*in vitro* study). Hum Psychopharmacol Clin Exp (2013), 28:1-6.
5. Miljević Č, Nikolić M, Nikolić-Kokić A, Jones DR, Niketić V, Lečić-Toševski D, Spasić MB. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry (2010), 34:303-7.

**др Драгана Филиповић, научни саветник (Институт за нуклеарне науке  
„Винча“ - Институт од националног значаја за Републику Србију,  
Универзитета у Београду)**

1. Filipović D, Perić I, Costina V, Stanisavljević A, Gass P, Findeisen P. Social isolation stress-resilient rats reveal energy shift from glycolysis to oxidative phosphorylation in hippocampal nonsynaptic mitochondria. *Life Sciences*, 2020, 254: 117790.
2. Perić I, Stanisavljević A, Gass P, Filipović D. 2017. Fluoxetine reverses behaviour changes in socially isolated rats: role of the hippocampal GSH-dependent defense system and proinflammatory cytokines. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 267(8):737-749.
3. Filipović D, Todorović N, Bernardi R, Gass P. 2016. Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. *Brain Structure and Function*, 222(1):1-20.
4. Zlatković J, Todorović N, Bošković M, Pajović S, Demajo M, Filipović D. 2014. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Molecular and Cellular Biochemistry* 393(1-2):43-57.
5. Inta D\*, Filipovic D\*, Lima-Ojeda JM\*, Dormann C, Pfeiffer N, Gasparini F, Gass P. 2012. The mGluR5 antagonist MPEP activates specific stress-related brain regions and lacks neurotoxic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801, significance for the use as anxiolytic/antidepressant drug. *Neuropharmacology* \*Equal contribution. 62(5-6):2034-2039.



Република Србија  
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ И  
ЗАШТИТЕ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ  
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-  
Број: 323-07-01893/2015-05/1  
Датум: 23.03.2015. године  
Београд

Министарство пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије-Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09), члана 192. Закона о општем управном поступку ("Службени гласник СРЈ" бр. 33/97 и 31/2001 и "Службени гласник РС" бр. 30/2010) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије бр. 119-01-5/5/2014-09, од 05.05.2014., решавајући о захтеву Института за нуклеарне науке "Винча" за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, доноси:

### РЕШЕЊЕ

**УСВАЈА СЕ** захтев Института за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом:

**"Молекуларни механизми стресног одговора, психотични поремећаји и ефекат антидепресива/анксиолитика".**

### Образложење

Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд, обратио се овом министарству дана 03.03.2015. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом "Молекуларни механизми стресног одговора, психотични поремећаји и ефекат антидепресива/анксиолитика".

Предати Образац захтева за одобрење спровођења огледа на животињама је имао недостатака, па је од стране Управе за ветерину, Министарства пољопривреде и заштите животне средине прослеђен допис за допуну захтева, предмет бр. 323-07-01893/2015-05, од дана 09.03.2015. године. Подносилац пријаве је одговорио на допис и доставио допуну Обрасца захтева, предмет бр. 323-07-01893/2015-05, од дана 17.03.2015. године. Поред тога, подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о

условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правог лица, попуњен захтев за издавање решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложену документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 192. Закона о општем управном поступку.

**Поука о правном средству:** Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.



**Доставити:**

1. Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, 11001 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1а/4, 11000 Београд
3. Евиденција,
4. Архива





**Institut za nuklearne nauke "Vinča"**  
**Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju**  
**P.O.Box. 522-090, 11001 Beograd, Srbija**  
**Tel/Fax+381 (11) 6455 561**

### **Revizija rešenja o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama**

Usvaja se zahtev dr Dragane Filipović, zaposlene u Laboratoriji za Molekularnu Biologiju i Endokrinologiju 090, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, za reviziju postojećeg rešenja o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama, pod nazivom „Molekularni mehanizmi stresnog odgovora, psihotični poremećaji i efekat antidepresiva/anksiolitika, pod brojem 323-07-01893/2015-05/1.

### **Obrazloženje**

Dr Dragani Filipović je dana 23.03.2015. godine, od Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine-Uprava za veterinu, dodeljeno Rešenje o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama, pod brojem 323-07-01893/2015-05/1, za period od 2015 do 2017 godine, pod nazivom „Molekularni mehanizmi stresnog odgovora, psihotični poremećaji i efekat antidepresiva/anksiolitika.

Dana 7.02.2017.godine, dr Dragana Filipović je Etičkoj komisiji Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ predala zahtev za reviziju treće godine (2017) postojeće navedene dozvole. Razlog revizije je preusmeravanje eksperimentalnog rada, gde se korišćenje već odobrenog broja laboratorijskih pacova (90) u okviru planiranog oglada preusmerava na nove instrumentalne metode kao što su tečna ili gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom, umesto transmissionog elektronskog mikroskopa, kao i dopuna lica koje sprovode oglede i to student doktorskih studija na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Andrijana Stanisavljević koja ima položen ispit „Nauka o laboratorijskim životinjama“ i student doktorskih studija na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Ivana Perić koja je bila u procesu obuke iz predmeta „Nauka o laboratorijskim životinjama“

Na sednici Etičke komisije, održanoj 09.02.2017. godine, na osnovu uvida u priloženu dokumentaciju, članovi Etičke komisije su dali pozitivno misljenje o opravdanosti sprovođenja novih oglada i reviziji postojeće dozvole pod brojem 323-07-01893/2015-05/1, uz manje dopune koje su naknadno poslate na uvid članovima EK 20.02.2017. godine. Na sednici održanoj 10.03.2017. godine, dr Dragane Filipović je obavestila članove Etičke komisije da je Ivana Perić u medjuvremenu uspešno završila kurs iz predmeta „Nauka o laboratorijskim životinjama“ (sertifikat priložen).

Beograd, 28.03.2017. godina

Predsednik Etičke komisije

Dr Miloš Mitić



Република Србија  
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,  
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ  
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-  
Број: 323-07-02256/2019-05  
Датум: 14.03.2019. године  
Београд

Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије-Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку ("Службени гласник РС", бр. 18/2016), члана 23., став 2., Закона о државној управи ("Службени гласник РС", бр. 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије, 119-01-5/14/2017-09 од 30.06.2017. године, решавајући о захтеву Института за нуклеарне науке "Винча" за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, Емина Милакара, в.д. директор доноси:

### РЕШЕЊЕ

**УСВАЈА СЕ** захтев Института за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом:

**"Компаративна метаболомска анализа и проинфламаторни одговор можданих региона пацова изложених хроничној изолацији и/или хроничном деловању различитих антидепресива и антипсихотика".**

### Образложење

Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд обратио се овом министарству дана 13.03.2019. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом: "Компаративна метаболомска анализа и проинфламаторни одговор можданих региона пацова изложених хроничној изолацији и/или хроничном деловању различитих антидепресива и антипсихотика".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правог лица, попуњен захтев за издавање решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложену документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку.

**Поука о правном средству:** Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.



**Доставити:**

1. Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, 11000 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1а/4, 11000 Београд
3. Евиденција,
4. Архива



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

**УВЕРЕЊЕ**

**Ивана Перић**

Завршила/о је обуку за

**РАД СА ЛАБОРАТОРИЈСКИМ ЖИВОТИЊАМА  
(КАТЕГОРИЈА В)**

Одговорни наставник

*Др Синиша Ђурашевић, ванредни професор*

У Београду, 29.03.2017.

Предметни наставник

Проф. др Синиша Ђурашевић



М.П.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Жељко Томановић