

## НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

### УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.12.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Мирослава Ацића и проф. др Надежде Недељковић о урађеној докторској дисертацији **Милоша З. Митића**, истраживач-сарадника Института за нуклеарне науке "Винча", Универзитета у Београду, под насловом **„Полно-специфичан ефекат флуоксетина на сигнализацију посредовану глукокортикоидним рецептором у хипокампусу пацова излаганих хроничном стресу изолације“**. На истој седници одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Мирослав Ацић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ - ментор, др Надежда Недељковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет - ментор, др Нађа Марић Бојовић, Универзитет у Београду – научни саветник, доцент Медицинског факултета – члан.

Комисија је прегледала докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

#### **Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација Милоша Митића, написана је на 144 стране и садржи поглавља: Увод (52 стране), Циљ рада (2 стране), Материјал и методе (12 страна), Резултати (23 стране), Дискусија (20 страна), Закључци (2 стране) и списак цитиране литературе (34 страна). Резултати представљени у дисертацији илустровани су графицима и панелима (31), а део резултата представљен је табеларно (6). У дисертацији је цитирано 383 библиографске јединице. Уз наведена поглавља, дисертација обухвата сажетак на српском и енглеском језику и списак примењених скраћеница, биографију кандидата, публиковане радове и неопходне изјаве.

#### **Анализа докторске дисертације:**

**Увод** докторске дисертације написан је у пет целина. У њему је дат детаљан приказ досадашњих сазнања из области које су непосредно везане за предмет дисертације. Поглавље започиње детаљним описом улоге стреса, његове дефиниције, као и поделе основних типова стресора. Даље, дат је детаљан опис физиолошких реакција организма у одговору на стресоре, при чему је нарочита пажња посвећена сазнањима о активацији хипоталамо-хипофизно-адrenalне (ХПА) осе као главне компоненте неуроимуноендокриног система, као и хипокампуса, структуре лимбичког мозга, који учествује у регулацији ХПА осе, а уједно је место изражене реактивности на стрес због велике концентрације глукокортикоидог рецептора (ГР). Следеће поглавље увода „Депресија“ посвећено је дефинисању њених основних карактеристика, клиничке слике и класификације овог психијатријског поремећаја, затим структурне промене које се јављају код депресивних пацијената у односу на здраве особе као и биолошким основама патогенезе овог поремећаја и полних разлика које постоје у развоју депресије. Такође дат је приказ основних теорија које представљају главне молекуларне механизме који леже у основи депресије са фокусом на моноаминску теорију, која претпоставља недостатак моноamina (највише серотонина) у синаптичкој пукотини и глукокортикоидну (ХПА) теорију која сугерише нарушену функцију ХПА

осе као главне узроке настанка депресије. У следећем поглављу „Глукокортикоиди и сигнални пут посредован ГР-ом“ дат је преглед литературе о молекуларним механизмима деловања глукокортикоидних хормона као и сигнализацији посредованој ГР-ом, његовој структури и функцији које могу бити измењене у депресији. Дат је и детаљан приказ како функција ГР-а може бити измењена фосфорилацијом, посттранслационом модификацијом на специфичним аминокиселинским остацима, као и измењена активност усходних киназа које фосфорилишу ГР (MAPK, CDK5 и GSK-3 $\beta$ ). Следећи део увода „Анимални модели депресије“ посвећен је коришћењу анималних модела депресије и описа ефеката стреса на различите параметре понашања код животиња са посебним акцентом на модел хроничне социјалне изолације који се сматра моделом који је најближи људским студијама психосоцијалног стреса. На крају последњи део увода „Антидепресиви“ је посвећен њиховој класификацији као и механизмима којим остварују своје дејство. Главни фокус је на употреби флуоксетина, антидепресива из класе селективних инхибитора поновног уноса серотонина (ССРИ), као и његовог ефекта на функцију ГР-а и сигнализацију која је посредована њиме.

У поглављу **Циљ рада** кандидат прецизно дефинише циљеве докторске тезе и експерименталне задатке у оквиру тих циљева. Циљ истраживања у оквиру предвиђене докторске тезе јесте да се испита деловање флуоксетина, антидепресива из класе ССРИ, на активност ХПА осе, ендокрине параметре, као и на промене понашања у животињском моделу депресије, са основним циљем да се опишу евентуалне полно-специфичне разлике у деловању овог антидепресива. У оквиру анализе активности ХПА осе испитивана је експресија ГР-а, као и гена регулисаних ГР-ом, степен фосфорилације ГР и способност транслокације између ћелијских одељака, као и активност усходних киназа које га фосфорилишу. Разумевање начина на који флуоксетин остварује утицај на сигнализацију посредовану ГР-ом у одговору на хроничан стрес доприноси не само ефикаснијој терапији, већ и бољем разумевању етиологије поремећаја расположења узрокованих хроничним стресом код људи, , нарочито са аспекта полова.

У том циљу у овој тези анализирани су следећи параметри:

1. Утицај хроничног третмана флуоксетином на понашање налик депресивном код пацова оба пола излаганих хроничном стресору социјалне изолације.
2. Утицај хроничног третмана флуоксетином на концентрацију кортикостерона у серуму пацова оба пола излаганих хроничном стресору социјалне изолације.
3. Утицај хроничног третмана флуоксетином на ниво укупног ГР-а, и његову дистрибуцију у цитосолу и једру хипокампуса мозга пацова оба пола излаганих хроничном стресору социјалне изолације.
4. Утицај хроничног третмана флуоксетином на ниво фосфорилације ГР-а на S232, S246 и T171, с обзиром на то да фосфорилације на овим аминокиселинама значајно утичу на транскрипциону активност ГР-а.
5. Утицај хроничног третмана флуоксетином на ниво и активност усходних киназа које фосфорилишу ГР; CDK5, MAPK (JNK, ERK и p38) и GSK3 $\beta$  у хипокампусу пацова оба пола излаганих хроничном стресору социјалне изолације.

6. Утицај хроничног третмана флуоксетином на ниво експресије гена за ГР и ГР-регулисаних гена, као што су BDNF, CRH, 5-HT1a, p11 и  $\beta$ -арестина 2, у хипокампусу пацова оба пола излаганих хроничном стресору социјалне изолације.

У поглављу **Материјал и методе** кандидат даје детаљан преглед општих и специфичних хемикалија, као и опис експерименталних група, третмана и примењених метода. Експерименти у оквиру ове докторске тезе изведени су на одраслим пацовима соја Вистар оба пола, одгајеним у локалној узгајивачници Института за нуклеарне науке Винча у Београду. Сви експерименти и поступци третирања животиња одобрени су од стране Етичког комитета Института за нуклеарне науке „Винча“.

- (1) Животиње су насумично подељене у четири групе: (а) контролне нестресираних животиње третиране растварачем у којем је растворен флуоксетин (б) контролне нестресираних животиње третиране флуоксетином (дневна доза 5 мг/кг телесне масе); (ц) животиње излагане хроничном стресору социјалне изолације (6 недеља) и третиране растварачем; и (д) животиње излагане хроничном стресору социјалне изолације (6 недеља) и третиране флуоксетином;
- (2) Промене понашања изазване стресом и/или под утицајем флуоксетина испитане су тестом форсираног пливања;
- (3) Изолација крви и дисекција хипокампуса;
- (4) Одређивање концентрације кортикостерона у серуму животиња ELISA методом;
- (5) Раздвајање цитосолне и једарне фракције ткива хипокампуса методом диференцијалног центрифугирања;
- (6) Детекција укупне експресије ГР-а, његових фосфо-изоформи, као и MAPK, CDK5 и GSK3 $\beta$  киназа као и њихових фосфо-форми у цитосолној и једарној фракцији, поступком имуноблотинга и применом специфичних антитела;
- (7) Изоловање укупне RNK и детекција промена нивоа специфичне iRNK за гене регулисане ГР, као што су гени за ГР, BDNF (неуротрофни фактор пореклом из мозга), CRH (кортикотропни ослобађајући хормон), 5-HT1a (серотонински рецептор), p11 и  $\beta$ -арестин 2 ген, методом real time-PCR у ткиву хипокампуса.

У поглављу **Резултати**, сагласно формулисаним експерименталним задацима, кандидат даје детаљан опис и графички приказ добијених резултата. Хронични третман флуоксетином успео је да нормализује понашање претходно нарушено хроничном социјалном изолацијом на полно-специфичан начин и то независно од нивоа КОРТ-а. Даље, иако флуоксетин није утицао на хипоактивност ХПА осе он је неутралисао промене изазване стресом на нивоу укупног једарног ГР-а, као и на нивоу његових фосфороме, pGR246 и pGR171, у хипокампусу животиња оба пола. Насупрот њима флуоксетин је показао полно-специфичан ефекат на нивоу pGR232 изоформе, где је код стресираних женки повећао ниво те фосфорилације, док код мужјака није мењао исту. Овај пораст у нивоу pGR232 код стресираних женки праћен је даље комплетном активацијом свих испитиваних усходних киназа, CDK5, MAPK и GSK-3 $\beta$ , предоминатно у једру, док је код мужјака ефекат флуоксетина ограничен само на активацију JNK у цитосолу и GSK-3 $\beta$  у једру. Ова активација сигналне путање, pGR232/киназе под дејством флуоксетина у једру хипокампуса стресираних женки праћена је повећањем транскрипционе активности ГР-а преко повећања експресије гена за BDNF и CRH, док је код мужјака овај ефекат изостао. Ефекти флуоксетина код стресираних мужјака огледали су се у нормализацији других гена попут 5HT1a и p11, као и нормализацији CRH, али на другачији начин у односу на женке. Све ове промене

на молекулском нивоу како у одговору на стрес тако и под дејством флуоксетина у потпуности су одговарале променама у понашању тих животиња. Даље ови резултати сугеришу да су фосфорилације ГР-а на С232 и С246 транскрипционо активне, док се фосфорилација на Т171 показала више одговорном за локализацију и ћелијску дистрибуцију ГР-а под дејством флуоксетина у хипокампусу стресираних животиња оба пола.

У поглављу **Дискусија** кандидат анализира добијене експерименталне податке и интерпретира их уз осврт на релевантне публиковане резултате уз обимно коришћење литературе.

Резултати ове докторске тезе допуњују досадашња сазнања о нарушености глукокортикоидне сигнализације унутар мождане структуре хипокампуса у одговору на хронични стрес, показујући да је фосфорилација ГР-а, важан начин регулације његове функције, такође измењена код стресираних животиња и то на полно специфичан начин а што доприноси нарушености функције ГР-а у одговору на стрес.

Даље резултати ове докторске дисертације пружају информације о потенцијалном полно-специфичном молекуларном механизму/сигнализацији унутар хипокампуса који може бити одговорни за терапеутско дејство флуоксетина, ССРИ антидепресива. Код стресираних женки терапијски ефекат флуоксетина претпоставља модулацију ГР функције, првенствено преко измене фосфорилационог статуса ГР-а на серину 232 у једру и комплетне активације усходних киназних сигнала, CDKK5 и MAPK, што за последицу има промену транскрипционе активности ГР-а која се огледа у измењеној експресији ГР-регулисаних гена, пре свега BDNF и CRH. Код мужјака подвргнутих стресу резултати ове тезе указују да је нормализација понашања под дејством флуоксетина више везана за нормализацију укупног једарног ГР-а и његову фосфорилацију на серину 246, независно од испитиваних киназа, као и нормализацију експресије гена за CRH, 5HT1a и p11.

Такође резултати ове докторске дисертације пружају додатне информације у циљу дизајнирања ефикасније и полно-специфичне терапије у поремећајима распложења изазваних стресом, са главним фокусом на депресију.

У поглављу **Закључци** кандидат даје синтезу и објашњење постигнутих резултата. Резултати описани у овој докторској дисертацији имали су за циљ бољи увид у физиолошке и молекуларне промене, као и промене понашања и потенцијалне полне-специфичне механизме преко којих хронични третман флуоксетином, делује на активност ХПА осе и сигнализацију посредовану ГР-ом у хипокампусу животиња излаганих хроничном стресу социјалне изолације. На основу анализе добијених података могу се извести следећи закључци.

Хроничан третман флуоксетином:

- нормализовао је понашање нарушено хроничном социјалном изолацијом код пацова на полно-специфичан начин.
- није имао ефекта на хипоактивност ХПА осе детектоване у условима хроничне социјалне изолације код животиња оба пола.
- неутралисао је промене на нивоу једарног ГР-а претходно измењеног хроничном социјалном изолацијом у хипокампусу животиња оба пола.

- код стресираних женки модулисао је функцију ГР-а, првенствено преко рGR232 фосфорилације и активације усходних киназа у једру, што је за последицу имало промену транскрипционе активности ГР-а. Код мужјака овај ефекат флуоксетина је изостао.

- показао је да су фосфорилације ГР-а на C232 и C246 транскрипционо активне, док се фосфорилација на T171 показала више одговорном за локализацију и ћелијску дистрибуцију ГР-а у хипокампусу стресираних животиња.

успео је нормализује рGR232/BDNF сигнализацију код стресираних женки, што додатно објашњава већу терапијску ефикасност антидепресива из класе ССРИ код жена у односу на мушкарце.

Све заједно, поред тога што ови резултати потврђују раније наводе да антидепресиви испољавају свој ефекат преко модулације ГР функције, они додатно показују да антидепресиви мењају активност рецептора делујући на фосфорилацију ГР-а и усходне киназе, са посебним нагласком на полно-специфичан механизам дејства флуоксетина ССРИ антидепресива.

У поглављу **Литература** дата је листа од 383 библиографске јединице. Приказане научне публикације се односе на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су адекватно, тако да доприносе објашњењу и афирмацији добијених резултата.

## **Б. Библиографија:**

### **Радови у међународним часописима (M20):**

1. **M23 Mitic M**, Simic I, Djordjevic J, Radojcic MB, Adzic M. (2011) The Antidepressant Fluoxetine Normalizes the Nuclear Glucocorticoid Receptor Evoked by Psychosocial Stress. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. December 2011, Volume 85, Issue 13, pp 2422–2425. doi:10.1134/S0036024411130152.

<http://link.springer.com/article/10.1134/S0036024411130152>

2. **M21A Mitic M**, Simic I, Djordjevic J, Radojcic MB, Adzic M. (2013) Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. *Neuropharmacology*. 2013 Jul; 70:100-11. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.12.012.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390813000117>

3. **M23 Mitic M**, Lukic I, Bozovic N, Djordjevic J, Adzic M (2014) Fluoxetine Signature on Hippocampal MAPK Signalling in Sex-Dependent Manner. *Journal of Molecular Neuroscience*, February 2015, Volume 55, Issue 2, pp 335–346. doi:10.1007/s12031-014-0328-1.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12031-014-0328-1>

## Мишљење и предлог Комисије

На основу анализе докторске дисертације кандидата **Милоша З. Митића**, под насловом „Полно-специфичан ефекат флуоксетина на сигнализацију посредовану глукокортикоидним рецептором у хипокампусу пацова излаганих хроничном стресу изолације“, Комисија закључује да резултати ове тезе доприносе разумевању молекуларних механизма преко којих ССРИ антидепресиви остварују дејство, модификујући фосфорилациони статус ГР-а и функцију рецептора. Резултати дисертације представљају оригиналан научни допринос у овој области.

Имајући увид у рад кандидата, чланови Комисије посебно истичу да је кандидат показао самосталност и компетентност током израде докторске дисертације, као и да је адекватно применио савремене методе и приступе у молекуларној биологији који су обезбедили резултате вредне публикавања у међународним часописима највишег ранга. Истраживања поткрепљена добром теоријском основом, као и постигнути резултати, и изведени закључци представљају помак у разумевању полно-специфичног механизма дејства флуоксетинана фосфорилацију глукокортикоидног рецептора и на њиме посредовану сигнализацију, у животињском моделу депресије. Добијени резултати највећим делом потврђују поставке глукокортикоидне теорије депресије. Поред публикација насталих у оквиру докторске дисертације, посебно истичемо да је кандидат учествовао и у другим редовним експериментима у својој лабораторији, у оквиру уже области својих истраживања, и да је у својој научној каријери публиковао 17 радова у међународним часописима највишег ранга, као и бројна саопштења на међународним и домаћим скуповима.

На основу свега изнетог, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Милоша З. Митића**, под насловом „Полно-специфичан ефекат флуоксетина на сигнализацију посредовану глукокортикоидним рецептором у хипокампусу пацова излаганих хроничном стресу изолације“, и одобри кандидату јавну одбрану рада.

**КОМИСИЈА:**

---

др Мирослав Ацић, виши научни сарадник  
Универзитет у Београду -  
Институт за нуклеарне науке „Винча“

---

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

---

др Нађа Марић-Бојовић, научни саветник, доцент  
Универзитет у Београду - Медицински факултет “

У Београду, 15.12.2016.