

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 07.09.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Драгане Филиповић и др Јелене Ђорђевић, о урађеној докторској дисертацији Невене Р. Тодоровић, истраживача сарадника Института за нуклеарне науке „Винча”, Универзитета у Београду, под насловом “Ефекти флуоксетина и клозапина на антиоксидативни систем и параметре инфламације у мозгу и јетри пацова у условима хроничне изолације”, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Драгана Филиповић, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча”, Универзитета у Београду, др Јелена Ђорђевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Снежана Б. Пајовић, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча”, Универзитета у Београду и редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Предмет истраживања докторске дисертације Невене Р. Тодоровић је испитивање антиоксидативних, имуномодулаторних и хепатотоксичних ефеката антидепресива флуоксетина и антипсихотика клозапина на мужјацима пацова соја Wistar, у условима хроничне изолације. Докторска дисертација представља оригинално истраживање урађено у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију, Института за нуклеарне науке „Винча”, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација је написана на 162 стране и садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима (Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци), Литературу, као и Прилоге (Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу). Дисертација садржи 41 слику, 12 табела и 412 наслова у поглављу Литература, који се адекватно наводе у тексту.

Анализа докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације је испитивање ефеката антидепресива флуоксетина и антипсихотика клозапина на компоненте глутатион (GSH)-зависног антиоксидативног система и медијаторе инфламације у хипокампусу и пречеоној зони коре церебрума

хронично изолованих пацова, као експерименталног модела за изучавање депресије. Такође, анализирани су промене у броју парвалбумин позитивних (PV+) интернеурона у медијалној пречеоној зони коре церебрума пацова у условима хроничне изолације, са циљем да се прошире сазнања везана за патофизиологију стања налик депресији. Применом флуоксетина и клозапина код нестресираних и изолованих пацова изучаван је утицај ових лекова на поменуте параметре, као и њихов заштитни ефекат у условима хроничног стреса. Одређивањем параметара антиоксидативног система, оксидативних оштећења и хистолошких карактеристика јетре, испитивани су и хепатотоксични ефекти ових лекова.

У поглављу **УВОД** кандидаткиња даје приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Први део Увода посвећен је описивању одговора на стрес, као и утицају стреса на мозак, са акцентом на хипокампус и пречеону зону коре церебрума. Поред тога, дат је приказ досадашњих сазнања која упућују да је оксидативни стрес у мозгу, изазван хроничним стресом, један од водећих узрочника психијатријских поремећаја, уз навођење главних прооксиданата и компонената антиоксидативне заштите. У другом делу Увода, у кратким цртама је описана депресија, као и хипотезе о њеној етиологији са посебним освртом на моноаминску, GABA и инфламаторну хипотезу. У трећем делу Увода, у коме су представљени животињски модели депресије, посебна пажња је посвећена хроничној изолацији коришћеној у овој докторској дисертацији. У четвртом делу који је посвећен психотропним лековима, дат је кратак преглед и класификација антидепресива и антипсихотика, као и детаљан опис главних карактеристика и познатих механизма деловања флуоксетина и клозапина, лекова чији су ефекти анализирани у овом истраживању. Пети, последњи део Увода, посвећен је хистолошким карактеристикама и патологији јетре, са акцентом на до сада познате утицаје стреса и лекова на овај орган.

Поглавље **ЦИЉЕВИ** садржи јасно дефинисане циљеве истраживања. Предмет ове докторске дисертације је испитивање антиоксидативних, имуномодулаторних и хепатотоксичних ефеката флуоксетина и клозапина у животињском моделу депресије. Дефинисани су посебни циљеви који обухватају испитивање утицаја хроничне изолације пацова, као и хроничног третмана флуоксетином и клозапином на понашање, антиоксидативни систем и параметре инфламације у хипокампусу и пречеоној зони коре церебрума, као и GABA сигнализацију, односно број PV+ ћелија у медијалној пречеоној зони коре церебрума, и параметре оксидативних оштећења, антиоксидативне заштите и хистолошке промене у јетри.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** кандидаткиња је детаљно описала третман којима су пацови подвргавани, као и методолошке поступке који су примењивани у истраживању. У студији су коришћени мужјаци пацова Wistar соја, одгајани у локалној узгајивачници Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, уз одобрење Етичког Комитета Института за нуклеарне науке „Винча“. Пацови су подељени у шест експерименталних група: три групе нестресираних и три групе хронично изолованих пацова. Нестресирани животиње су гајене у стандардним условима, по четири у кавезу, док су изоловани пацови смештани појединачно у кавезе током 21 дана, без визуелног и тактилног контакта са другим јединкама. У оквиру обе групе животиња, једна подгрупа је интраперитонеално третирана флуоксетином (дозом од 15 mg/kg/дан), друга клозапином (дозом од 20 mg/kg/дан), а трећа физиолошким раствором током 21 дана. Стресирани пацови су третирани паралелно са изолацијом. Поред тога, у овом поглављу описани су тестови понашања, затим жртвовање пацова и изолација ткива јетре, хипокампуса и пречеоне зоне коре церебрума и начин припреме цитосолних и једарних фракција из изолованих ткива. Такође, описане су спектрофотометријске методе којима је

одређивана концентрација протеина, ниво GSH, као и активност ензима глутатион пероксидазе (GPx), глутатион редуктазе (GLR), глутатион-S трансферазе (GST), ниво метаболита NO, као и биохемијских маркера оштећења протеина и липида. Описано је и електрофоретско раздвајање протеина и Western blot анализа, у циљу релативне квантификације испитиваних протеина (GPx; GLR; нуклеарни фактор-κB, NF-κB-p65; циклооксигеназа-2, COX-2; интерлеукин-1β, IL-1β; фактор некрозе тумора α, TNF-α; CuZn супероксид-дисмутаза, CuZnSOD). Описана је и имунофлуоресцентна метода којом је утврђиван број PV+ ћелија у подрегионима медијалне пречеоне зоне коре церебрума, као и хистолошка анализа јетре. На крају поглавља, описани су тестови помоћу којих је рађена статистичка анализа добијених резултата.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** прегледно су представљени експериментални резултати у оквиру шест одвојених одељака. У првом одељку представљени су резултати тестова понашања који су показали да хронична изолација изазива симптоме који наликују очају, анхедонији и анксиозности, а да третмани флуоксетином, односно клозапином, онемогућавају развој ових симптома код изолованих пацова.

У другом одељку представљени су резултати биохемијских и имуноблот анализа хипокампуса који су показали да је изолација значајно смањила активност GPx ензима у овој можданој структури, као и да је заједничко деловање изолације и лекова компромитовало функционисање GSH-зависног антиоксидативног система тако што је смањило количину и активност ензима GPx и GLR. Поред тога, резултати су показали да ни изолација, ни третмани испитиваним лековима не доводе до транслокације NF-κB-p65 из цитоплазме у једро. Такође, показано је да изолација доводи до повећања нивоа TNF-α, али не и IL-1β и COX-2 у хипокампусу, као и да третмани флуоксетином и клозапином одржавају ниво TNF-α код изолованих на нивоу забележеном код контролних пацова.

У трећем одељку представљени су резултати биохемијских и имуноблот анализа пречеоне зоне коре церебрума који су показали да је изолација повећала антиоксидативну активност посредовану GPx ензимом и смањила ниво GSH. Третман флуоксетином је, у пречеоној зони коре изолованих пацова, одржао GSH на нивоу забележеном код контролних животиња, док клозапин није испољио протективно дејство. Такође, показано је да изолација доводи до транслокације NF-κB-p65 из цитосола у једро у ћелијама пречеоне зоне коре церебрума, и да флуоксетин и клозапин онемогућавају ову транслокацију код изолованих пацова. Резултати су још показали да изолација повећава ниво COX-2, IL-1β и TNF-α у овој можданој структури, а да флуоксетин, као и клозапин, током стреса испољавају имуномодулаторно дејство, будући да онемогућавају изолацијом индуковано повећање.

У четвртном одељку представљени су резултати имунофлуоресцентне анализе који су показали да изолација доводи до смањења броја PV+ ћелија у свим подрегионима медијалне пречеоне зоне коре церебрума, као и да флуоксетин и клозапин испољавају протективни ефекат у прелимбичком (PrL) и инфралимбичком (IL) подрегиону.

У петом одељку представљени су резултати биохемијских и имуноблот анализа јетре који су показали да третмани флуоксетином и клозапином изазивају оксидативна оштећења протеина и липида како у јетри изолованих, тако и нестресираних пацова, као и да сама хронична изолација такође доводи до ових оштећења. Поред тога, показано је да изолација и испитивани лекови, пре свега клозапин, појачавају антиоксидативну активност посредовану ензимом GST и компромитују GSH-зависну одбрану у јетри. Затим, показано је да изолација доводи до повећане производње NO у јетри, као и да клозапин повећава ниво нитрита у јетри нестресираних и изолованих пацова, а да флуоксетин не утиче на овај параметар код обе групе животиња. Такође је установљено да

изолација доводи до транслокације NF- κ B-p65 у једро ћелија јетре пацова, и да флуоксетин, за разлику од клозапина, спречава транслокацију овог транскрипционог фактора у једро ћелија јетре изолованих пацова.

У последњем одељку, приказани резултати хистолошке анализе указали су да је спектар хистолошких карактеристика јетре изолованих пацова који су примали физиолошки раствор сличан оном који је уочен код контролних пацова, као и да третман флуоксетином није изазвао крупне промене на нивоу структуре ткива јетре како нестресираних, тако и изолованих пацова. Такође, показано је да је клозапин, за разлику од флуоксетина, изазвао упадљиве промене у јетри нестресираних и изолованих пацова.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** дата је упоредна анализа резултата ове докторске дисертације и података из литературе. У првом делу анализирани су антидепресивни и анксиолитички ефекти флуоксетина и клозапина уочени у овој студији, као и они већ описани у литератури. У другом делу дискутоване су промене у оквиру GSH-зависног система и параметара инфламације у хипокампусу и пречеоној зони коре церебрума које се подударају са променама понашања пацова у условима хроничне изолације. Поред тога дискутовани су ефекти флуоксетина и клозапина на испитиване молекуларне промене у одабраним регионима мозга нестресираних и изолованих пацова. У трећем делу анализиран је резултат који сугерише да је смањен број PV+ инхибиторних интернеурона медијалне пречеоне зоне коре укључен у развој понашања налик депресивном код пацова у условима хроничне изолације, као и да је протективно деловање флуоксетина и клозапина на ове интернеуроне у PrL и IL подрегиону веома значајно за спречавање промена у понашању изолованих пацова. Четврти део дискусије посвећен је разматрању резултата који се односе како на утицај флуоксетина и клозапина на оксидативна оштећења и параметре антиоксидативног система у јетри нестресираних и изолованих пацова, тако и на утицај саме изолације на дате параметре. Дискутоване су могуће импликације ових промена на хистолошке промене јетре пацова који су излагани изолацији, флуоксетину или клозапину или комбинованом ефекту изолације и испитиваних лекова.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** сажето и јасно су представљени најважнији закључци који су у складу са постављеним циљевима, као и добијеним експерименталним резултатима у овој докторској дисертацији. Закључено је да проинфламаторне промене у хипокампусу и пречеоној зони коре церебрума, као и дисрегулација GABA сигнализације у медијалној пречеоној зони коре мозга пацова имају удела у патогенези симптома који наликују депресивним код пацова у условима хроничне изолације. Поред тога, закључено је да флуоксетин и клозапин остварују протективно дејство када је реч о проинфламаторним променама изазваним изолацијом у оба испитивана мождана региона и спречавају нарушавање инхибиције у PrL и IL подрегиону медијалне пречеоне зоне коре, доприносећи тиме антидепресивним и анксиолитичким својствима. На крају, закључено је да испитивани лекови изазивају оксидативна оштећења у јетри пацова, али да само клозапин изазива упадљиве хистопатолошке промене.

На крају докторске дисертације налази се поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа од 412 библиографских јединица које су од значаја за предмет истраживања ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Zlatković J*, **Todorović N***, Tomanović N, Bošković M, Djordjević S, Lazarević-Pašti T, Bernardie RE, Djurdjević A, Filipović D., 2014. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: A histopathological study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 59:20-30. doi: 10.1016/j.ejps.2014.04.010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24768740> **M21**

*- podjednak doprinos u radu

2. **Todorović N**, Filipović D., 2017. Prefrontal cortical glutathione-dependent defense and proinflammatory mediators in chronically isolated rats: Modulation by fluoxetine or clozapine. *Neuroscience.* 4;355:49-60. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.044. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28499974> **M22**
3. **Todorović N**, Filipović D., 2017. The antidepressant- and anxiolytic-like effects of fluoxetine and clozapine in chronically isolated rats involve inhibition of hippocampal TNF- α . *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 163:57-65. doi: 10.1016/j.pbb.2017.10.006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29042248> **M22**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Todorović N**, Bošković M, Filipović D. Fluoxetine failed to prevent isolation-induced changes of glutathione-dependent defense in rat hippocampus. 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade 22-26. September 2014. **M33**
2. Bošković M, **Todorović N**, Filipović D. Compromised glutathione-dependent redox system of chronically isolated rats: a harmful side effect of clozapine. 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade 22-26. September 2014 **M33**
3. **Todorović N**, Filipović D. Glutathione-dependent defense and proinflammatory response in the prefrontal cortex of chronically-isolated rats: modulation by fluoxetine or clozapine treatment. FENS Featured Regional Meeting, Thessaloniki, 7-10. October 2015. **M34**
4. **Todorović N**, Filipović D. Chronic social isolation reduces parvalbumin-positive interneurons in the medial prefrontal cortex of adult rats: protection by fluoxetine and clozapine. SINAPSA Neuroscience Conference. Ljubljana, Slovenia, May 15th-17th, 2015. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Мишљење и предлог Комисије:

На основу наведеног у овом Извештају, Комисија сматра да резултати кандидаткиње Невене Р. Тодоровић представљају оригинални и значајни научни допринос, како у расветљавању молекуларних механизма деловања антидепресива флуоксетина и антипсихотика клозапина, тако и проширивању сазнања о патофизиологији депресије. Истраживачки поступак докторске дисертације је прецизно планиран, примењене су адекватне методе истраживања и обраде добијених резултата. Добијени резултати су свеобухватно и критички дискутовани и на основу њих су изведени одговарајући закључци. Резултати ове дисертације пружају информације о протективним својствима флуоксетина и клозапина у мозгу пацова у условима хроничне изолације, као и хепатотоксичним ефектима клозапина, што је значајно како са аспекта ефикасније употребе ових лекова у терапији пацијената, тако и одређивања безбедних доза флуоксетина, а нарочито клозапина. Остварени резултати публиковани су у оквиру три оригиналне међународне научне публикације што потврђује њихову значајност и актуелност. Резултати докторске дисертације представљају значајан допринос, како у оквиру основних истраживања молекуларне неуробиологије, тако и у оквиру побољшања квалитета и ефикасности клиничке праксе.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Невене Р. Тодоровић под насловом: „Ефекти флуоксетина и клозапина на антиоксидативни систем и параметре инфламације у мозгу и јетри пацова у условима хроничне изолације“.

КОМИСИЈА:

др Драгана Филиповић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча”

др Јелена Ђорђевић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Снежана Б. Пајовић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча”;
Редовни професор, Универзитет у Нишу – Медицински факултет

У Београду, 26.09.2018. године.