

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12.04.2019. године, на основу молбе ментора, Александре Младеновић Ђорђевић, вишег научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Смиље Т. Тодоровић, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ под насловом: „Утицај дуготрајне дијеталне рестрикције на инсулински сигнални пут у мозгу пацова током старења“, у саставу:

Др Александра Младеновић Ђорђевић, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,

Др Селма Каназир, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Др Данијела Лакета, доцент, Биолошки факултет

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију Кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду -Биолошког факултета подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Смиље Т. Тодоровић под насловом „Утицај дуготрајне дијеталне рестрикције на инсулински сигнални пут у мозгу пацова током старења“ написана је на 159 стране, садржи 6 табела и 28 слика, као и 457 библиографске јединице. Докторску дисертацију чине: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима (Увод – 32 стране; Циљ рада – 2 стране; Материјал и методе – 19 страна; Резултати – 31 страна; Дискусија – 30 страна; Закључак – 3 стране; Литература – 43 стране) и Прилози (Биографија аутора, Изјава о

ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу).

### Анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације, Кандидаткиња Смиља Т. Тодоровић описује промене које се у централном нервном систему дешавају током старења, а затим даје увид у постојећа сазнања из области дијеталне рестрикције (ДР) и њеног протективног потенцијала. Наведене су позитивне стране примене дијеталне рестрикције, почев од утицаја на продужење животног века, преко спречавања или одлагања појаве разних старосно зависних процеса, до протективног утицаја на неуродегенеративне болести. Кандидаткиња детаљно описује механизме деловања ДР, као и уобичајне експерименталне протоколе по којима се овакав режим примењује. Кандидаткиња истиче да се сматра да рестриктивни режим исхране има универзално корисно и протективно дејство, иако постоје резултати који указују да у ефектима ДР велику улогу могу играти временске одреднице, односно старост организма у тренутку увођења дијете, као и дужина трајања дијете, те да су утицаји ових фактора углавном неистражени. Затим се уводи и детаљно објашњава концепт крхкости (енгл.*frailty*), који је спрегнут пре свега са старењем, односно најчешће карактерише стару популацију. Кандидаткиња објашњава два основна приступа у одређивању степена крхкости.

Кандидаткиња затим наводи основне карактеристике енергетске хомеостазе у мозгу. Објашњен је принцип контроле енергетске хомеостазе и спрега са периферијом, односно серумом. Кандидаткиња описује улогу протеин киназе активираних аденозин-монофосфатом (АМПК), као унутарћелијског енергетског сензора и молекула директно укљученог у процесе метаболичке и синпатичке пластичности, као и последице његове фосфорилације, односно активације. Говори се о глукози, као главном извору енергије у мозгу, начину његовог уноса у мозак и преузимања од стране различитих типова можданих ћелија посредством специфичних глукозних транспортера. Кандидаткиња сумира постојеће податке о променама у количини и активности свих наведених молекула током старења и последице које ове промене имају на учење и памћење. Кандидаткиња даље детаљно описује улогу инсулина и инсулинског сигналног пута у мозгу, као и

промене које се дешавају током старења. Кандидаткиња објашњава дејство орексигених и анорексигених пептида у хипоталамусу и везу која постоји између инсулина, грелина, лептина и неуропептида ипсилон (NPY), уноса хране и контроле апетита, односно осећаја ситости и глади. Детаљно је објашњена инсулинска сигнализација у мозгу, његове молекулске компоненте и начин активације, као и значај овог сигналног пута у регулацији уноса хране и процесу учења и памћења. На крају овог поглавља, Кандидаткиња наводи литературне податке о дејству дијеталне рестрикције на инсулински сигнални пут и генерално на метаболизам глукозе и инсулина у мозгу.

У поглављу **Циљеви истраживања** Кандидаткиња полази од чињенице да је процес старења мозга спрегнут са низом структурних и функционалних промена, које за последицу имају постепен губитак моторних и когнитивних способности јединке. Кандидаткиња укратко наводи потенцијалне узроке који леже у основи старосно зависних неуродегенеративних болести, попут нарушене енергетске хомеостазе и промењене експресије протеина чија је улога одржавање дате хомеостазе у мозгу. Такође, наводи се и потенцијал дијеталне рестрикције као срединске интервенције способне да одложи или ублажи промене асоциране са старењем. С обзиром да се још увек не зна тачан протективни потенцијал дијеталне рестрикције на старосно зависне промене у енергетском метаболизму мозга, као и да ли протективни ефекат дијете зависи од типа дијете, старости организма када се дијета уводи и дужине њеног трајања, Кандидаткиња као главни циљ ове докторске дисертације поставља испитивање ефеката различитих типова дијеталне рестрикције на промене у когнитивним и моторичким способностима пацова и тиме одређивање режима исхране са максималним протективним потенцијалом на старосно зависне промене у мозгу. Како је у претходном раду Кандидаткиње дуготрајна рестрикција хране, као једне од најчешће примењиваних рестриктивних експерименталних парадигми, селектована као режим са максималним протективним потенцијалом, Кандидаткиња се даље фокусира на испитивање ефеката оваквог режима исхране, на експресију протеина укључених у енергетски метаболизам у мозгу, пре свега на инсулински сигнални пут.

Сходно овом општем циљу, Кандидаткиња поставља и одређене специфичне циљеве истраживања и то: испитивање утицаја старења и дијеталних рестрикција различитог почетка и дужине трајања на понашање *Wistar* пацова и одрђивање степена

крхкости, (енгл. *frailty score* (FS)), а у циљу детекције дијеталног режима са максималним протективним ефектом на промене асоциране са старењем; одређивање серумских параметара спрегнутих са енергетским метаболизмом, детекција промена у експресији протеина укључених у мождани енергетски метаболизам и синаптичку пластичност (глукозни транспортери и АМПК), као и протеина компоненти инсулинског сигналног пута.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно је изложена организација експеримента, подела експерименталних животиња у експерименталне групе и протоколи за све примењене технике, као и статистичка обрада добијених резултата. Све експерименталне процедуре су спроведене у сагласности са Директивом 2010/63/ЕУ о заштити животиња које се користе у експерименталне и научне сврхе и одобрене од стране етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду (под бројем 2/59/12).

У експерименту су коришћени мужјаци пацова *Wistar* соја, старости од 6 до 24 месеца, што одговара различитим фазама живота: јединке старости 6 -12 месеци које се сматрају адултима, односно зрелим јединкама, јединке старости 15-18 месеци које одговарају средњој доби код људи, док се 21 и 24 месеца старе јединке сматрају старом групом. Јединке су подвргнуте дијеталном режиму који је подразумевао смањени унос хране за 40% у односу на контролне, *ad libitum* (АЛ) животињекоје су храну конзумирале неограничено. Формиране су три различите дијеталне групе у зависности од дужине трајања дијете и старосне доби у којој је дијета започета (шема приказана на слици 3.1). Дијета која је најдуже трајала и која је почела са навршених 6 месеци, ДР1, је коришћена за испитивање молекуларних промена.

У тестовима понашања експерименталне животиње су тестиране у два теста, на основу којих се стекао увид у њихове моторичке и когнитивне способности, и одредио степен крхкости. Тест отвореног поља је рађен током пет дана, док је тест ипсилон лавиринта рађен у току једног дана. Праћена је спонтана моторичка активност, и то у комерцијалним аренама са аутоматским системом регистрације активности животиње (Opto-Varimex cages, Columbus Instruments, ОН), док је тест лавиринта сниман камером и снимак даље анализиран од стране експериментатора.

У сврхе одређивања релативних промена у експресији протеина од интереса коришћена је *Western blot* метода, док су протеини изоловани из следећих можданих региона од интереса: коре великог мозга, хипокампуса и хипоталамуса. Протеини чија је експресија анализирана *Western blot* методом су: АМПК, глукозни транспортери 1,3 и 4 (GLUT1-4), NPY, инсулин, инсулински рецептор бета (IR $\beta$ ), супстрат инсулинског рецептора (IRS1) и протеин киназа Б (Akt). Релативне вредности нивоа протеина су добијене семиквантитативном анализом имуноблотова у односу на *Ponceau S* бојење које је служило као контрола наношења узорача.

Добијени резултати су статистички обрађени коришћењем *GraphPadPrism* софтверског пакета (San Diego, CA) и представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка, односно као средња вредност без приказаних грешака за представљање резултата крхкости.

У поглављу **Резултати** експериментално добијени подаци су класификовани у логично организоване целине и јасно графички приказани. Праћењем моторне и вертикалне активности животиња у тесту отвореног поља показано је да током старења не долази до промена у понашању *Wistar* пацова који су били на режиму неограниченог уноса хране, док је дијетална рестрикција хране имала значајан утицај на понашање животиња, а тај утицај је зависио од типа рестрикције. Тако је дијетална рестрикција отпочета у адултном узрасту и са најдужим трајањем показала користан ефекат, односно довела је до повећања моторне и/или вертикалне активности, док остали дијетални режими или нису доводили до промена или су те промене биле штетне, попут изостанка нормалне хабитуације код животиња код којих је ДР отпочет у 21. месецу живота и који је трајао свега 3 месеца. Анализа просторне меморије у тесту ипсилон лавиринта је пак показала штетан утицај старења који се огледао у смањењу вредности одређених параметара теста код АЛ животиња, као и користан ефекат дуготрајне дијеталне рестрикције и штетан ефекат краткотрајне рестрикције хране. Процена стања крхкости код свих експерименталних група је указала на исти феномен и потврдила корисно дејство дуготрајног рестриктивног режима исхране и одсуство ефеката или пак штетни ефекат краткотрајног смањења уноса хране.

Даља анализа дејства дијеталне рестрикције на нивоу серумских параметара инсулина, глукозе, холестерола и триглицерида је показала да су сви рестриктивни

режими исхране углавном доводили до смањења испитиваних серумских параметара, нарочито у тачки од 24 месеца. Даља анализа ефеката дуготрајног рестриктивног режима је показала да је ДР1 довео до регионално специфичних промена у експресији АМПК и GLUT протеина, повећавајући експресију АМПК и његове фосфорилисане форме у хипокампусу 24 месеца старих пацова, и експресију глукозних транспортера GLUT1 и GLUT3 у кори великог мозга. Регионална специфичност у одговору на ДР1 режим се детектовала и на нивоу инсулинског сигналног пута, где је детектована смањена количина укупне и фосфо форме IR $\beta$  и IRS1 у хипокампусу, а активација IRS1 и повећање нивоа укупног Akt протеина у хипоталамусу. Ниво инсулина је био повећан под дејством ДР1 и у хипокампусу и у хипоталамусу код 24 месеца старих животиња. Пратећи ниво експресије NPY протеина дошло се до резултата да се његова количина не мења са старењем, док је ДР1 режим исхране повећавао његову количину у хипокампусу и хипоталамусу у каснијим добима живота.

У **Дискусији** добијених резултата Кандидаткиња је објаснила детектоване промене уочене током процеса старења и под утицајем рестриктивних режима исхране, узимајући у обзир потпуно одсуство литературних податка о компаративном приступу у испитивању потенцијалног протективног дејства различитих типова дијеталних рестрикција. Посебна пажња је посвећена дискусији промена детектованих на тестовима понашања, као и степена крхкости, који је по први пут окарактерисан на *Wistar* соју пацова. Резултати добијени у оквиру прве тематске целине која је обухватала испитивање понашања животиња и одређивање степена крхкости током старења и под утицајем различитих режима исхране, су по први пут указали да током старења долази до пораста степена крхкости код овог соја, као и да дијетална рестрикција има значајан утицај на степен крхкости током старења, те да га може мењати, било у позитивном, било у негативном правцу.

Резултати у оквиру друге тематске целине у којој су анализирани биохемијски параметрису показали да старење доводи до промена у нивоу глукозе и триглицерида, без утицаја на нивое инсулина и холестерола. Услед бројних старосно-зависних болести које су повезане са повећаним нивоом инсулина, глукозе и серумских липида, један од корисних ефеката ДР1 режима се угледа управо у смањењу нивоа поменутих параметара, али и одржавању ових параметара на нивоу који је забележен код младих животиња. Са

друге стране, краћи дијетални режими нису испољили позитивно дејство у свим испитиваним временским тачкама, а уз то су имали и негативан ефекат, повећавајући нивое појединих параметара.

Резултати добијени у оквиру треће тематске целине, где је праћен енергетски метаболизам, синаптичка пластичност, експресија компоненти инсулинског сигналног пута и регулација уноса хране, су показали да старење не доводи до промена у протеинима који су укључени у поменуте процесе. Узимајући у обзир одуство промена на молекуларном нивоу у комбинацији са забележеним променама само појединих серумских параметра, можемо претпоставити да *Wistar* пацови не показују патолошке промене током старења. Значајан утицај ДР1 се огледао у бољој снабдевености коре великог мозга и хипокампуса довољном количином енергије. Повећана експресија и активација АМПК, главног унутарћелијског енергетског сензора и протеина са кључном улогом у одржању синптичког интегритета ћелије, у комбинацији са повећањем нивоа NPY и смањењем активности инсулинског сигналног пута, детектована у хипокампусу, би могла имати улогу у уоченом побољшању когнитивних перформанси. Вероватно је да је повећање нивоа NPY протеина у хипоталамусу старих животиња имало важну улогу у спречавању појаве старосно-зависне анорексије, док повећан ниво инсулина у хипокампусу и хипоталамусу код најстарије групе животиња указује на могућност да ДР1 стимулише *de novo* синтезу инсулина.

У поглављу **Закључци** сумирани су и јасно наведени резултати добијени у овој докторској дисертацији.

У поглављу **Литература** наведене су 457 библиографске јединице, што указује да је Кандидаткиња темељно и студиозно приступила изучавању проблематике докторске дисертације.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Todorovic S**, Smiljanic K, Ruzdijic S, Mladenovic Djordjevic A, Kanazir S. Effects of Different Dietary Protocols on General Activity and Frailty of Male Wistar Rats During Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(8):1036-1044. doi: 10.1093/gerona/gly015.**M21a**  
<https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/73/8/1036/4837193>
2. Smiljanic K, **Todorovic S**, Mladenovic Djordjevic A, Vanmierlo T, Lütjohann D, Ivkovic S, Kanazir S. Limited daily feeding and intermittent feeding have different effects on regional brain energy homeostasis during aging. *Biogerontology* 2018;19(2):121-132. doi: 10.1007/s10522-018-9743-y.**M21**<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10522-018-9743-y>

B2. Kongresna saopšteња na skupovima meђunarodnog značaja

1. **Todorović S**, Smiljanić K, Prvulovic M, Kanazir S, Mladenović Đorđević A. Effect of different dietary regimens on frailty score during aging. (D6) VII kongres Društva za neuronauke Srbije sa međunarodnim učešćem, 25-27. oktobar 2017, Beograd, poster br.D6. Organizator: Društvo za neuronauke Srbije. ISBN 978-86-7078-136-8.  
M32
2. Smiljanić K, **Todorović S**, Mladenović Đorđević A, Vanmierlo T, Lutjohann D, Ivković S, Kanazir S. Brain energy homeostasis during aging-influence of limited daily feeding and intermittent feeding (D1).VII kongres Društva za neuronauke Srbije sa međunarodnim učešćem, 25-27. oktobar 2017, Beograd, poster br.D1. Organizator: Društvo za neuronauke Srbije  
M32
3. **Todorović S**, Mladenović Đorđević A, Smiljanić K, Macura I, RakićLj, Kanazir S. The course of aging is altered by different protocols of dietary restriction: assessment through behavioral and frailty measurements. IUBMB focused meeting on ‘Molecular Aspects of Aging & Longevity’ in Athens, 16-19th of October 2017. Pp20  
M32
4. **Todorović S**, Mladenović-Đorđević A, Smiljanić K, Kanazir S. Long-term dietary restriction modulates insulin signaling pathway in aging brain. First Congress of Molecular Biologists of Serbia with international participation.20 – 22 September 2017, Belgrade, Serbia. Abstract book: pp 82. ISBN 978-86-7078-136-8.  
M32



5. Smiljanić K, **Todorović S**, Mladenović Đorđević A, Ruždijić S, Rakić Lj, Kanazir S. Influence of diverse feeding regimes on ampk expression, glucose transport and cholesterol metabolism in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged rats. In: Sobajic S, editor. Book of Abstracts - 13th Congress of Nutrition: Food and Nutrition – A Roadmap to Better Health; 2016 Oct 26-28; Belgrade, Serbia. p.122 Serbian Nutrition Society: 2016  
M34
6. **Todorović S**, Mladenović-Đorđević A, Smiljanić K, Pešić V, Ruždijić S, Kanazir S. Long-term dietary restriction modulates brain insulin and neuropeptide Y expression and exploratory behavior in middle-aged rats. In: De Luca M, editor. E-Book of Abstracts - 10th FENS Forum of Neuroscience; 2016 July 4-6; Copenhagen, Denmark. Abstract number: FENS-3195;p. Organizator: Federation of European Neuroscience Societies (FENS).  
M34
7. Mladenović Đorđević A, Smiljanić K, **Todorović S**, Rakić Lj, Ruždijić S, Kanazir S. Dietary restriction affects rat behavior in age-specific manner. MO136. FENS Featured Regional Meeting (FFRM), Ioannis Vellidis Congress Center, Thessaloniki, Greece, 7-10 October 2015. FENS, Hellenic Society for Neuroscience, Israel Society for Neuroscience, Serbian Neuroscience Society.  
M34

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

### **Мишљење и предлог Комисије**

Увидом у докторску дисертацију Смиље Т. Тодоровић, Комисија са задовољством констатује да приказани резултати дају важан научни допринос разумевању последица старења и различитих дијеталних режима на моторне и когнитивне способности, као и на степен крхкости животиња. Ова студија има нарочити значај у разумевању ефеката примене дуготрајног рестриктивног режима исхране на енергетски метаболизам централног нервног система током старења, а посебно на инсулинску сигнализацију у

мозгу и њену везу са процесима учења и памћења. Кандидаткиња је показала добро познавање литературе и проблематике релевантне научне области, као и висок степен истраживачке зрелости.

О резултатима добијеним у оквиру овог истраживања, интерпретацији и значају истих додатно говори податак да су објављени у два врхунска међународна часописа, од тога један M21a категорије из области старења и геронтолошких наука.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације Смиље Т. Тодоровић, под насловом „Утицај дуготрајне дијеталне рестрикције на инсулински сигнални пут у мозгу пацова током старења“, као и број и квалитет научних радова који су објављени на основу добијених резултата дисертације, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације Кандидаткиње Смиље Т. Тодоровић.

**У Београду, 18.04.2019. године**

**КОМИСИЈА:**

---

Др Александра Младеновић Ђорђевић, виши научни сарадник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

---

Др Селма Каназир, научни саветник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

---

Др Данијела Лакета, доцент  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду