

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

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 16.11.2022. године, на основу молбе ментора, др Маје Живковић, научног саветника Института за нуклеарне науке „Винча”- Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Маје М. Бубић, рођ. Бошковић**, стручног саветника Института за нуклеарне науке „Винча” - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом: **„Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia L.*) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом“**, у саставу: др Александра Станковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, проф. др Биљана Божић Недељковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду и др Горан Корићанац, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду.

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 Маје М. Бубић, рођ. Бошковић, под насловом **„Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia L.*) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом“**, представља оригинално дело које за циљ има испитивање везе између оксидативног стреса и инфламације у срцу пацова, изазваних прекомерним уносом фруктозе, као главног узрока развоја метаболичког синдрома, као и потенцијалних антиоксидативних, антиинфламаторних/имуномодулаторних ефеката суплементације орасима, који у метаболичким поремећајима још увек нису довољно испитани.

Ова докторска дисертација која садржи 66 страна, 13 слика, 1 график, 2 табеле и 1 схему структурирана је на следећи начин:

- **Уводне стране**, које садрже: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, Скраћенице и Садржај (12 страна које нису нумерисане).

- **Текст по поглављима** (6 поглавља): **Увод** (17 страна), **Хипотеза и циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (8 страна), **Резултати** (10 страна), **Дискусија** (8 страна) и **Закључци** (1 страна)

- **Литература** (285 референци на 21 страни)

- **Биографија аутора** (страна није нумерисана)

- **Приложене изјаве:** Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу (4 стране које нису нумерисане).

## АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** се састоји од осам подналова. У оквиру првог подналова описане су карактеристике, порекло и метаболизам фруктозе, као незаобилазне компоненте савременог начина исхране, и дат је кратак приказ досадашњих литературних података о повезаности исхране богате фруктозом са развојем метаболичког синдрома (MetC). Описане су и карактеристике MetC-а који обухвата абдоминалну гојазност, инсулинску резистенцију, хиперинсулинемију, хипертензију и дислипидемију, поремећаје који повећавају ризик за настанак кардиоваскуларних болести и дијабетеса типа 2. У оквиру другог подналова описан је животињски модел MetC-а - лабораторијски пацов соја Wistar који се подвргава исхрани обогаћеној 10% или 20% раствором фруктозе, што најверније опонаша данашњи начин исхране индустријском храном обогаћеном фруктозом, газираним пићима и заслађеним воћним соковима. У оквиру трећег подналова описана је метаболичка инфламација, као хронична инфламација ниског интензитета која претходи развоју инсулинске резистенције која лежи у основи MetC-а. Посебан осврт дат је на метаболизам у срцу у физиолошким условима и условима инсулинске резистенције. У оквиру четвртог подналова сумирани су досадашњи литературни подаци о оксидативном стресу у MetC-у, пре свега у срцу, као и антиоксидативна оса АМР-активирана протеин киназа (АМПК) - сиртуин 1 (SIRT1) - FoxO3a (engl. *Forkhead box O3*) – митохондријска манган супероксид дисмутаза (MnSOD)/каталаза за коју је претходно показано да је компромитована исхраном богатом фруктозом, а чији су негативни регулатори NADPH оксидаза 4 (Nox4) и ChREBP (engl. *Carbohydrate Response-Element-Binding Protein*) такође предмет истраживања ове докторске дисертације. У оквиру петог подналова говори се о карактеристикама и улози ренин-ангиотензин система (РАС), са посебним освртом на његове главне компоненте које су анализирани у овој докторској дисертацији (ангиотензински рецептор типа 1 (AT1R), ангиотензински рецептор типа 2 (AT2R), ангиотензин конвертујући ензим (ACE) и ангиотензин конвертујући ензим 2 (ACE2)). Посебан осврт дат је и на локални РАС у срцу. У шестом поднаслову анализиран је транскрипциони фактор NF-κB (engl. *Nuclear Factor-kappa B*) чија активација доводи до повећане продукције проинфламаторних цитокина који имају централну улогу у хроничној инфламацији која прати метаболичке поремећаје. У оквиру седмог подналова описана је веза између РАС-а, оксидативног стреса и инфламације као кључних фактора у инсулинском сигналном путу који лежи у основи MetC-а. У последњем делу увода изнети су литературни подаци о полинезасићеним масним киселинама (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA), са посебним освртом на n-3 PUFA које имају антиоксидативни и антиинфламаторни/имуномодулаторни ефекат на срце. На крају, дат је кратак преглед досадашњих истраживања која се односе на корисне ефекте конзумације орашастих плодова, а пре свега ораха који садрже највећу количину n-3 PUFA и један су од најбогатијих нутритивних извора антиоксиданаса, па суплементација орасима може представљати потенцијално моћну нефармаколошку стратегију у терапији кардиометаболичких болести. Иако је показано да ораси имају позитивне ефекте на

метаболичко здравље, специфични механизми који леже у основи ових ефеката нису у потпуности познати.

Поглавље **Хипотеза и циљеви** јасно дефинише хипотезу ове докторске дисертације која гласи: суплементација исхране орасима представља нутритивни третман који има потенцијално корисне ефекте на промене изазване повећаним уносом фруктозе на:

1. митохондријску осу метаболичког стреса – AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/каталаза у срцу пацова, као и на негативне регулаторе ове осе - Nox4 и ChREBP
2. маснокиселински однос (n-6/n-3 масних киселина) у циркулацији и у срцу у корист n-3 PUFA
3. активацији пута који регулише инфламацију променама у експресији NF-κB и компонената PAC-а (ACE, ACE2, AT1R и AT2R)

Истраживање је спроведено на мужјацима пацова Wistar соја који су били подељени у четири експерименталне групе према режиму исхране: (I) стандардна исхрана, (II) стандардна исхрана обогаћена 10% раствором фруктозе (15 недеља), (III) стандардна исхрана уз суплементацију орасима последњих шест недеља трајања експеримента и (IV) исхрана богата фруктозом уз свакодневну конзумацију ораха (2,4 г/дан) последњих шест недеља трајања експеримента.

Из наведеног проистичу научни циљеви докторске дисертације, који гласе:

1. Утврдити систолни (енгл. *en*gl. *Systolic Blood Pressure*, SBP) и дијастолни крвни притисак (енгл. *Diastolic Blood Pressure*, DBP), као и срчану фреквенцију (енгл. *Heart Rate Frequency*, HRF) мужјака пацова у све четири експерименталне групе животиња.
2. Идентификовати и квантификовати арахидонску киселину (AA), еикозапентаенску киселину (EPA) и докозахексаенску киселину (DHA) у укупном пулу липида у плазми и срцу пацова. Одредити однос n-6/n-3 PUFA (AA/EPA, AA/DHA) у све четири експерименталне групе животиња.
3. Утврдити ниво AMPK, ChREBP и FoxO3a у цитосолу и једру, као и ниво SIRT1, MnSOD, каталазе и Nox4 у укупном лизату ткива срца мужјака пацова, у све четири експерименталне групе животиња.
4. Утврдити ниво компонената PAC-а (ACE, ACE2, AT1R и AT2R) и транскрипционог фактора NF-κB у укупном лизату изолованих протеина из ткива срца мужјака пацова, у све четири експерименталне групе животиња.
5. Утврдити ниво експресије гена који кодирају AT1R и AT2R у ткиву срца мужјака пацова у све четири експерименталне групе животиња.

Поглавље **Материјал и методе** је подељено у 14 подналова. Први поднаслов се односи на карактеризацију ораха коришћених у студији, према њиховом пореклу и хемијском саставу. У оквиру другог подналова садржан је опис експерименталних група

према режиму исхране, број животиња које су учествовале у студији, опис лабораторијских услова у којима су животиње гајене, опис начина прикупљања и чувања узорака до тренутка даље анализе. У експерименту је учествовало 36 мужјака пацова Wistar соја који су подељени у четири експерименталне групе према режиму исхране (9 пацова по експерименталној групи). Реализацију студије одобрила је Етичка комисија за рад са огледним животињама Института за нуклеарне науке „Винча”, а експериментални протоколи су изведени у складу са смерницама Директиве Европског парламента (2010/63/EУ).

Остали поднаслови садрже опис експерименталних метода које су коришћене у реализацији наведених циљева. Енергетски унос (кЈ/дан/пацов) из сваког појединачног извора (стандардна лабораторијска храна, раствор фруктозе, ораси) бележен је свакодневно и изражен је као проценат укупног енергетског уноса за дату групу животиња. Телесна маса мерена је седмично у току трајања студије, док је маса срца одређена након изолације срца из организма (апсолутна) и изражена је у односу на укупну телесну масу (релативна). SBP и DBP, као и HRF, измерени су по завршетку експеримента, код свесних пацова, неинвазивним, компјутеризованим “tail-cuff” системом. Средњи артеријски притисак (енгл. *Mean Arterial Pressure*, MAP) и пулсни притисак (енгл. *Pulse Pressure*, PP) израчунати су на основу датих формула. Описане су методе за издвајање укупних липида из плазме и срца пацова, као и поступци за раздвајање масних киселина гасном хроматографијом, идентификацију и квантификацију AA, EPA и DHA и утврђивање односа AA/EPA и AA/DHA. У наредним поднасловима описана је припрема ћелијског лизата, цитосолне и једарне фракције из ткива срца пацова, као и одређивање концентрације протеина BCA методом, уз употребу комерцијалног кита. Затим су описани поступци за одређивање нивоа протеина који су најпре раздвојени методом SDS електрофорезе на полиакриламидном гелу (SDS-PAGE), након чега су циљни протеини (AMPK, SIRT1, FoxO3a, MnSOD, каталаза, Nox4, ChREBP, ACE, ACE2, AT1R, AT2R и NF-κB) детектовани применом комерцијалних антитела Western blot методом и квантификовани дензитометријом помоћу ImageJ софтвера. Описани су протоколи и методе за екстракцију укупне ћелијске РНК из ткива срца, као и метода за квантитативну и квалитативну проверу узорака РНК. Описане су методе третмана екстраховане РНК дезоксирибонуклеазом I која претходи реверзној транскрипцији узорака РНК. Након тога је описана и метода за квантификацију генских транскрипата на основу квантификације њима одговарајућих комплементарних ДНК, RT-PCR (енгл. *Realtime Polymerase Chain Reaction*). За одређивање релативних нивоа иРНК за AT1R и AT2R коришћени су комерцијални TaqMan® експресиони есеји, а реакције су изведене према упутству из протокола произвођача. За статистичку анализу добијених података коришћен је софтверски пакет Statistica 8. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација (SD) од три независна експеримента изведена са 9 животиња по свакој експерименталној групи. Резултати су анализирани помоћу two-way ANOVA (енгл. *analysis of variance*), процењујући утицај фактора - исхране богате фруктозом и суплементације ораха, као и њихову интеракцију, након чега је урађен Tukey’s post-hoc тест за процену разлика између појединачних група. Вредност  $p < 0.05$  сматрана је статистички значајном.

Поглавље **Резултати** подељено је у пет подналова који јасно, кроз графичке приказе и табеле уз њима придодата објашњења презентују добијене резултате ове студије.

Први поднаслов описује ефекте исхране богате фруктозом и суплементације орасима на енергетски унос, укупну телесну масу, релативну масу срца, крвни притисак, срчани ритам, MAP и PP код експерименталних животиња, који су приказани табеларно уз објашњење. На укупну телесну масу експерименталних пацова на крају студије, утицала су оба фактора, и исхрана богата фруктозом и суплементација орасима. Пацови који су подвргнути исхрани са додатком ораха имали су већу телесну масу у односу на пацове који нису конзумирали орахе. Са друге стране, детектовано је значајно смањење релативне масе срца искључиво као последица суплементације орасима. Конзумација ораха је повезана и са смањењем систолног крвног притиска код пацова на исхрани богатој фруктозом.

Други поднаслов описује ефекте исхране богате фруктозом и суплементације орасима на однос AA/EPA и AA/DHA у укупним липидима плазме (табеларни приказ) и срца (графички прикази) пацова. Наводи се да је детектовано смањење односа AA/EPA и AA/DHA у плазми, као и смањење односа AA/EPA у срцу након суплементације орасима код пацова који су били на фруктозној исхрани.

У оквиру трећег поднаслова испитани су ефекти исхране богате фруктозом и суплементације орасима на ниво компонената антиоксидативне осе AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/каталаза, као и њених негативних регулатора, Nox4 и ChREBP у срцу пацова, а резултати су приказани као слике које садрже график и слику скенираног блота за дати протеин. Кандидаткиња наводи да је ова антиоксидативна оса, компромитована исхраном са високим садржајем фруктозе, уравнотежена након суплементације орасима. Ниво Nox4 је повећан и након исхране богате фруктозом и након суплементације орасима, док је ниво ChREBP у једру смањен након исхране богате фруктозом, као и код контролних пацова који су конзумирали орахе.

Четврти поднаслов тиче се ефеката исхране богате фруктозом и суплементације орасима на експресију молекула PAC-а, а резултати су приказани као слике које садрже график и слику скенираног блота за дати протеин. Наведено је да је исхрана богата фруктозом значајно повећала ниво ACE у срцу, док је суплементација орасима значајно повећала ниво ACE2 након фруктозне исхране. Међутим, на протеински/иРНК ниво AT1R и AT2R није утицао ниједан од два нутритивна фактора.

Ефекти исхране богате фруктозом и суплементације орасима на ниво NF-κB у срцу пацова издвојени су као пети поднаслов, а резултати су приказани као слика која садржи график и слику скенираног блота за NF-κB. Истакнуто је да суплементација орасима није успела да поништи значајан ефекат исхране богате фруктозом на повећање нивоа NF-κB.

У поглављу **Дискусија**, добијени резултати су критички разматрани и појашњени у односу на актуелна сазнања из тематике. Поглавље прати ток представљених резултата и подељено је у шест поднаслова у којима су сумиране сличности и разлике у досадашњим литературним подацима са добијеним резултатима докторске дисертације. На основу свега наведеног, истакнуто је да промене у навикама у исхрани могу имати дугорочне корисне ефекте по кардиометаболичко здравље. Последњи поднаслов овог поглавља схематски сумира добијене резултате који се тичу ефеката исхране богате фруктозом и суплементације орасима на циљне молекуле у срцу, као и са њима асоциране молекуле из литературе који повезују PAC, оксидативни стрес и инфламацију у заједничке путеве повезане са инсулинском резистенцијом која лежи у основи метаболичких поремећаја.

**Закључци** сумирају експерименталне резултате приказане у оквиру ове докторске дисертације. Кандидаткиња наводи да је изведена студија потврдила корисне ефекте конзумације ораха на кардиометаболички статус и предложила механизме који су у основи њихових антиинфламаторних и антиоксидативних ефеката у срцу, указујући на могућност развоја нових, нефармаколошких приступа у терапији кардиометаболичких болести. Из свега наведеног дефинисани су следећи закључци:

1. SIRT1-FoxO3a-MnSOD/каталаза антиоксидативна оса, компромитована исхраном са високим садржајем фруктозе, уравнотежена је након суплементације орасима.

2. SIRT1 има улогу нутритивног сензора који преноси сигнале одговорне за метаболичко стање и инфламаторне процесе у срцу, па би корисни ефекти конзумације ораха на SIRT1 могао представљати основу за даљи развој нутритивне стратегије у погледу очувања срца у MetC-у.

3. Конзумација ораха је показала значајан ефекат на смањење односа AA/EPA и AA/DHA у плазми, што представља значајно антиинфламаторно дејство. У срцу, фруктоза и ораси стимулишу преузимање и оксидацију масних киселина, али за разлику од фруктозе, суплементација орасима примарно повећава ниво и метаболизам n-3 PUFA.

4. Детекција експресије ChREBP-a у срцу, до сада недовољно истражена у моделу MetC-a, представља значајан допринос у области. Исхрана богата фруктозом и суплементација орасима утичу на његову експресију и у цитосолу и у једру. Ипак потребно су даља истраживања у циљу разумевања ефеката суплементације орасима.

5. Суплементација орасима у трајању од шест недеља код пацова изложених исхрани богатој фруктозом, позитивно утиче на ниво ACE2 и однос AA/EPA у срцу, кардиопротективне компоненте, што доприноси заштити срца у MetC-у.

6. Стимулација ACE2/Ang 1-7 осе PAC-a може представљати важан терапеутски приступ у лечењу кардиометаболичких болести, па суплементација орасима може представљати потенцијално моћну нефармаколошку стратегију.

У поглављу **Литература** дата је листа 285 библиографских јединица, које су адекватно цитиране и наведене у докторској дисертацији.

## **РАДОВИ И КОНГРЕСНА САОПШТЕЊА ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

### **Б1. Радови у часописима међународног значаја:**

1. **Bošković M, Živković M, Korićanac G, Stanišić J, Zec M, Krga I, Stanković A.** Walnut Supplementation Restores the SIRT1-FoxO3a-MnSOD/Catalase Axis in the Heart, Promotes an Anti-Inflammatory Fatty Acid Profile in Plasma, and Lowers Blood Pressure on Fructose-Rich Diet. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021:5543025. DOI: 10.1155/2021/5543025.

**M21**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33976753/>

- Romić S, Tepavčević S, Popović T, Zec M, Stojiljković M, Ćulafić T, **Bošković M**, Korićanac G. Consumption of walnuts suppresses the conversion of palmitic to palmitoleic acid and enhances omega-3 fatty acid metabolism in the heart of fructose-fed rats. *Int J Food Sci Nutr.* 2022; 73(7):940-953. DOI: 10.1080/09637486.2022.2107186.

**M22**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35918845/>

- Bošković M**, Živković M, Korićanac G, Tepavcevic S, Zec M, Debeljak-Martacic J, Stanković A. Walnut supplementation after fructose-rich diet is associated with a beneficial fatty acid ratio and increased ACE2 expression in the rat heart. *Front Physiol.* 2022; 13:942459. DOI: 10.3389/fphys.2022.942459.

**M21**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36213224/>

## **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:**

- Bubić M**, Živković M, Stanišić J, Korićanac G, Stanković A. Walnuts protect male rat heart against fructose-rich diet induced oxidative stress and blood pressure increase. 6 th meeting of European section and 7 th meeting of North American section of the international academy of cardiovascular sciences (IACS). Vrnjacka Banja, Serbia, September 11 th -14 th, 2019, Page 154. **M34**

## **Провера оригиналности докторске дисертације**

Докторска дисертација кандидаткиње Маје М. Бубић, рођ. Бошковић, Б3027/2013, послата је дана 14.11.2022. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор, др Маја Живковић, добила је дана 14.11.2022. На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације, „Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia* L.) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом”, аутора Маје М. Бубић, рођ. Бошковић, ментор је констатовао да утврђено подударње текста износи 19%. Овај степен подударности последица је преклапања назива на енглеском и српском језику у оквиру појашњења порекла скраћеница коришћених у тексту и општих места и података, назива инструмената или метода коришћених током израде студије, као и претходно публикованих резултата истраживања који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Већина преклапања по сегментима износе 1% или мање од 1%.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, ментор је оценио да извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Маје М. Бубић, рођ. Бошковић, под насловом „Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia* L.) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## **Мишљење и предлог Комисије:**

Комисија сматра да је кандидаткиња **Маја М. Бубић, рођ. Бошковић** током израде докторске дисертације показала висок степен познавања научне основе проблематике, добро дефинисала циљеве научног истраживања, применила адекватне методе у истраживању и обради добијених резултата које је критички дискутовала, уз исцрпне податке из литературе. Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију. Добијени резултати истраживања приказани у докторској дисертацији у складу су са постављеним циљевима истраживања, а закључци произлазе из добијених резултата. Резултати докторске дисертације ће помоћи да се боље сагледа веза између оксидативног стреса и инфламације у срцу, изазваних прекомерним уносом фруктозе, као и потенцијални антиоксидативни, антиинфламаторни/имуномодулаторни ефекти суплементације орасима, који у метаболичким поремећајима још увек нису довољно испитани. Добијени резултати, осим базичног аспекта, имају транслациони потенцијал у развоју нових, нефармаколошких приступа у терапији кардиометаболичких поремећаја. Резултати ове докторске дисертације објављени су у три научна рада (категорије M21) од којих је у два рада Маја М. Бубић, рођ. Бошковић први аутор.

На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације **Маје М. Бубић, рођ. Бошковић** под насловом „**Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia* L.) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом**“.

У Београду, 16.11.2022. године

**Комисија:**

---

**др Александра Станковић**, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча”- Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

---

**др Биљана Божић Недељковић**, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

**др Горан Корићанац**, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча”- Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду