

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

На I редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 20.01.2023. године, на основу молбе ментора, др Сађе Ковачевић научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“- Института од националног значаја за Републику Србију и др Предрага Вујовића ванредног професора Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Abdulbaseta Z. Shirif-a, студента докторских студија Универзитета у Београду-Биолошког факултета, под насловом: „Интеракције сигналних путева инсулина, лептина и глукокортикоида у хипоталамусу и скелетном мишићу пацова током метаболичких поремећаја изазваних исхраном обогаћеном фруктозом и стресом“ („*Cross-talk of insulin, leptin and glucocorticoid signaling in the rat hypothalamus and skeletal muscle during metabolic disturbances induced by dietary fructose and stress*“) у следећем саставу: др Ана Ђорђевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор Универзитета у Београду-Биолошког факултета и др Снежана Којић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

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

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација **Abdulbaset Z. Shirif-a** под насловом „Интеракције сигналних путева инсулина, лептина и глукокортикоида у хипоталамусу и скелетном мишићу пацова током метаболичких поремећаја изазваних исхраном обогаћеном фруктозом и стресом“ („*Cross-talk of insulin, leptin and glucocorticoid signaling in the rat hypothalamus and skeletal muscle during metabolic disturbances induced by dietary fructose and stress*“), написана је на 103 стране и подељена у 8 поглавља: **Увод** (20 страна), **Циљ рада** (2 стране), **Материјал и методе** (10 страна), **Резултати** (17 страна), **Дискусија** (15

страна), **Закључци** (2 стране), **Литература** (19 страна) и **Прилози** (6 страна). Рад садржи 251 литературни цитат, 26 слика и 4 табеле. Дисертација садржи и уводне непагиниране стране где се налазе: Подаци о тези и члановима комисије, Сажетак на енглеском и српском језику, Захвалница, Списак скраћеница и Садржај.

### **Анализа докторске дисертације**

У **Уводу**, кандидат Abdulbaset Z. Shirif кроз 2 поглавља и 8 потпоглавља даје детаљан преглед података из научне литературе који су непосредно везани за предмет и проблематику докторске дисертације. У првом поглављу Увода под насловом „Енергетски баланс“, кандидат нас упознаје са дефиницијом енергетске хомеостазе и значајем њеног одржавања за здравље организма, истичући да инсулинска, лептинска и глукокортикоидна сигнализација имају важну улогу у овом процесу. У потпоглављу под насловом „Инсулински сигнални пут“, кандидат детаљно описује актере и сигналне молекуле укључене у пренос сигнала инсулина у различитим типовима ћелија, као и улогу инсулина у регулацији нивоа глукозе, метаболизму липида и одржавању енергетске хомеостазе. Потпоглавље „Инсулинска резистенција и њена улога у хипоталамусу и скелетним мишићима“, се односи на услове настанка и развој резистенције на инсулин, као и на метаболичке последице инсулинске резистенције у хипоталамусу и скелетним мишићима. У потпоглављима „Лептински сигнални пут“ и „Глукокортикоидни сигнални пут“ кандидат нас ближе упознаје са функцијом лептина и глукокортикоидних хормона, као и молекуларним механизмима њиховог деловања која остварују преко лептинског односно глукокортикоидног рецептора. Кандидат се осврће на преглед улога лептина и глукокортикоида у одржавању хомеостазе са аспекта енергетског и метаболичког баланса. Друго поглавље Увода под називом „Енергетски дисбаланс“ нас, на супрот првом поглављу, информише о томе шта се дешава у организму када је енергетска хомеостаза нарушена фокусирајући се, кроз потпоглавље „Метаболички синдром“, на дефиницију и значај метаболичког синдрома у животу савременог човека, као и на до сада доступне информације о улогама које исхрана богата фруктозом (потпоглавље „Исхрана богата фруктозом и метаболички поремећаји“) и излагање стресу (потпоглавље „Стрес и метаболички поремећаји“) имају на појаву и развој овог синдрома. Потпоглавље под називом „Метаболичка инфламација“ разматра процес и значај инфламације, објашњава

услове настанка метаболичке инфламације и њен утицај и допринос на метаболичку функцију органа.

Имајући у виду да су исхрана богата шећерима и свакодневна изложеност стресу карактеристике савременог начина живота, у оквиру ове докторске дисертације праћени су њихови ефекти на развој метаболичких поремећаја коришћењем одговарајућег анималног модела. У ту сврху, у одељку **Циљеви**, дефинисан је главни циљ дисертације, а то је да се пружи интегративни поглед на сигналне путеве инсулина, лептина и глукортикоида у хипоталамусу и скелетном мишићу мужјака пацова након дуготрајне исхране богате фруктозом, излагања хроничном непредвидивом стресу и/или њиховој комбинацији, као и да се тестира хипотеза да комбинација третмана остварује штетније ефекте на метаболички статус испитиваних органа него сваки од третмана засебно. Да би се то остварило, дефинисани су следећи специфични научни циљеви:

1. Истражити да ли прекомерни унос фруктозе, изложеност стресу и/или њихова комбинација утичу на енергетски унос и телесну масу мужјака пацова
2. Утврдити да ли, и како, исхрана богата фруктозом и/или хронични стрес утичу на апетит и експресију орексигених и анорексигених неуропептида и анализирати сигнални пут лептина у хипоталамусу
3. Истражити да ли и како примењени третмани утичу на инсулински сигнални пут у хипоталамусу
4. Испитати метаболизам липида и глукозе у скелетним мишићима и евалуирати инсулински сигнални пут у овом органу након исхране богате фруктозом, хроничног стреса и њихове комбинације
5. Анализирати глукортикоидну сигнализацију и инфламаторни статус скелетних мишића након исхране обогаћене фруктозом, хроничног излагања стресу и њихове комбинације

У поглављу **Материјал и методе** наведене су апаратуре и хемикалије које су коришћене у експериментима. Кандидат је детаљно описао експерименталне групе и експерименталне методе, као и начин на који су обрађени и презентовани резултати.

У поглављу **Резултати** дат је детаљан приказ података добијених током израде ове докторске дисертације који су приказани на 15 слика. Приказ резултата који су статистички анализирани може се сумирати на следећи начин:

У циљу процене енергетског статуса животиња на дуготрајној исхрани богатој фруктозом, изложених хроничном стресу или њиховој комбинацији, свакодневно су мерени и бележени унос хране и течности, а потом је на основу тих података израчунат енергетски унос. Анализирани су и физиолошки и биохемијски параметри који описују метаболички статус животиња. Добијени резултати су показали да је исхрана обogaћена фруктозом довела до повећања енергетског уноса животиња које су пиле фруктозу, при чему је унос чврсте хране код ових животиња био смањен. Ипак, исхрана обogaћена фруктозом није довела до промене у укупној телесној маси. Животиње излагане стресу на стандардној исхрани имале су смањен индекс адипозности, који је рачунат као однос масе висцералног масног ткива и укупне масе животиња, док је додатак исхране обogaћене фруктозом код ових животиња вратио индекс адипозности на ниво контролних јединки. Комбинација исхране богате фруктозом и хроничног стреса довела је до повећања нивоа инсулина у плазми и смањења нивоа индекса инсулинске осетљивости R-QUICKI (енг. *Revised quantitative insulin-sensitivity check index*), који поред нивоа глукозе и инсулина узима у обзир и ниво слободних масних киселина у циркулацији. Концентрација хормона лептина у циркулацији била је смањена код животиња излаганих стресу и храњених стандардном храном, као и ниво експресије лептинског рецептора ObRb (енг. *Obesity receptor B*) и инхибитора лептинског сигналног пута SOCS3 (енг. *Suppressor of cytokine signaling 3*) у хипоталамусу. Анализом неуропептида за ситост и глад у хипоталамусу показано је да је комбинација фруктозе и стреса повећала ниво експресије орексигеног неуропептида AgRP (енг. *Agouti related peptide*) и смањила ниво експресије анорексигеног неуропептида POMC (енг. *Pro-opiomelanocortin*) у хипоталамусу. Резултати анализе сигналног пута инсулина у хипоталамусу показали су да комбинација исхране обogaћене фруктозом и хроничног стреса доводи до поремећаја овог сигналног пута судећи по смањеном нивоу активне фосфорилисане форме киназе Akt (pAkt-Ser<sup>473</sup>) (енг. *Protein kinase B*), односно повећаном нивоу активне фосфорилисане форме киназа ERK (pERK-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (енг. *Extracellular signal-regulated kinase*) и АМПК (pAMPK-Thr<sup>172</sup>) (енг. *5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase*). Осим тога, детектован је повећан ниво активне фосфорилисане форме и повећан укупни протеински ниво главног инхибитора инсулинског сигналног пута, PTP1B (енг. *Protein tyrosine phosphatase 1B*). Ни један од примењених третмана није утицао на промене протеинских нивоа транспортера за глукозу

GLUT1, GLUT2, GLUT3 (енг. *Glucose transporter 1/2/3*), инсулинског рецептора IRB (енг. *Insulin receptor B*), његове активне фосфорилисане форме (pIRB-Tyr<sup>1162/1163</sup>) као ни нивоа инхибирајуће фосфорилације првог нисходног сигналног молекула након инсулинског рецептора, pIRS1-Ser<sup>307</sup> (енг. *Insulin receptor substrate 1*).

Испитивањем липидног метаболизма у скелетним мишићима показано је да комбинација исхране богате фруктозом и излагање хроничном стресу доводи до повећања експресије липидних транспортера LPL (енг. *Lipoprotein lipase*) и FATP1 (енг. *Fatty acid transport protein 1*), ензима липолитичког пута ATGL (енг. *Adipose triglyceride lipase*) и главног транспортера масних киселина у митохондрије и једног од главних регулатора процеса  $\beta$ -оксидације масних киселина, CPT1B (енг. *Carnitine palmitoyltransferase 1B*). Комбинација третмана је повећала и нивое транскрипционих регулатора PPAR $\alpha$  и PPAR $\delta$  (енг. *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\delta$* ) који регулишу различите аспекте липидног метаболизма, и у мишићима су задужени и за преференцију липидних супстрата над глукозним у процесу добијања енергије. Стрес, примењен самостално као и у комбинацији са фруктозом, повећао је ниво транскрипционог регулатора проинфламаторних цитокина NF $\kappa$ B (енг. *Nuclear factor  $\kappa$ B*) и смањио однос инхибирајуће фосфорилисане форме pNF $\kappa$ B-Ser<sup>536</sup> према укупном протеину NF $\kappa$ B, указујући на активацију овог важног проинфламаторног регулатора. У складу са тим, обе експерименталне групе животиња излагане стресу имале су повећан ниво проинфламаторног цитокина TNF $\alpha$  (енг. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ). И док су животиње излагане стресу на стандардној исхрани имале повећан ниво кортикостерона у крвној плазми, обе групе животиња излагане стресу имале су, независно од исхране, повећан ниво кортикостерона у скелетним мишићима. Анализа пререцепторског метаболизма глукортикоида у скелетним мишићима показала је да су обе групе животиња излагане стресу имале смањену експресију гена који кодира 11 $\beta$ HSD1 (енг. *11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*), ензим задужен за унутарћелијску конверзију неактивне форме глукортикоида у активну. Ензим H6PDH (енг. *Hexose-6-phosphate dehydrogenase*) који обезбеђује кофактор NADPH (енг. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat*) за ову реакцију, није био промењен након примењених третмана. Ниво протеина и иРНК за глукортикоидни рецептор GR (енг. *Glucocorticoid receptor*), био је нижи у обе групе животиња које су биле на исхрани богатој фруктозом. Додатно, ниво инхибитора GR-а,

протеина FKBP51 (енг. *FK506 binding protein 51*) био је виши у скелетним мишићима животиња излаганих комбинацији третмана, док је у истој групи животиња била смањена и експресија гена *Klf15* (енг. *Kruppel like factor 15*) гена који се налази под транскрипционом регулацијом GR-ом. Животиње изложене комбинацији исхране богате фруктозом и хроничног стреса имале су смањен ниво IRS1, и смањен ниво активне фосфорилисане форме pIRS1-Tyr<sup>632</sup>, док је истовремено запажен повећан ниво инхибирајуће фосфорилације pIRS1-Ser<sup>307</sup>, као и смањен однос активирајуће и инхибирајуће фосфорилације pIRS1-Tyr<sup>632</sup>/pIRS1-Ser<sup>307</sup> у скелетним мишићима. Додатно, код истих животиња, ниво киназе Akt и његова активна фосфорилисана форма pAkt-Thr<sup>308</sup> били су смањени, док је забележен повећан ниво инхибитора инсулинског сигналног пута, протеина РТР1В.

У оквиру поглавља **Дискусија**, кандидат је интерпретирао и анализирао добијене експерименталне резултате уз критички осврт на литературне податке. У првом делу овог поглавља, које се односи на унос енергије и лептински сигнални пут у хипоталамусу дискутован је начин на који исхрана обогаћена фруктозом доводи до повећања енергетског уноса без утицаја на телесну масу, као и узроци смањења нивоа лептина у циркулацији и протеинског нивоа лептинског рецептора и инхибитора лептинског сигналног пута у хипоталамусу животиња излаганих стресу на стандардној исхрани. Иако су животиње које су пиле фруктозу уносиле мање чврсте хране, закључено је да је повећан унос раствора фруктозе довео до повећања укупне унете енергије, највероватније као последица повећања експресије орексигеног неуропептида AgRP и смањења анорексигеног неуропептида POMC. Промене у сигналном путу лептина су у складу са смањеном масом висцералног масног ткива уоченом код исте групе експерименталних животиња, с обзиром да је главно место синтезе и секреције лептина управо масно ткиво.

У следећем одељку Дискусије анализиран је ефекат исхране богате фруктозом и/или хроничног стреса на сигнални пут инсулина у хипоталамусу. На основу добијених резултата, закључено је да је инсулинска сигнализација нарушена у хипоталамусу животиња излаганих комбинацији исхране богате фруктозом и хроничног стреса кроз повећање нивоа протеина РТР1В, главног инхибитора инсулинског сигналног пута. Додатно, дискутован је и допринос који повећање нивоа активне фосфорилисане форме протеина енергетског сензора АМПК има у нарушеној инсулинској сигнализацији, с

обзиром да је познато да рАМПК може остварити инхибиторно дејство на Akt компоненту инсулинског сигналног пута. Инсулински сигнални пут анализиран је и у скелетним мишићима животиња на исхрани богатој фруктозом и/или излаганих хроничном, непредвидивом стресу. У овом поглављу дискусије детаљно је описана, и поређена са литературом, улога промене сваког од испитиваних сигналних молекула инсулинског пута који указује на смањење функције сигнализације инсулина у скелетним мишићима животиња излаганих комбинацији фруктозе и стреса (смањен ниво протеина IRS1, pIRS1-Tyr<sup>632</sup>, однос pIRS1-Tyr<sup>632</sup> и pIRS1-Ser<sup>307</sup>, повећан ниво протеина PTP1B и однос pIRS1-Ser<sup>307</sup> и IRS1). У наредном одељку дискутовано је како смањење нивоа протеина и иРНК за GR, смањење транскрипције гена *Klf15* регулисаног GR-ом, и повећање протеина инхибитора глукокортикоидног пута (FKBP51) утичу на смањење функције глукокортикоидног сигналног пута у скелетним мишићима након исхране богате фруктозом. Дискутовано је и како смањена функција сигналног пута глукокортикоида може олакшати развој инфламације који је детектован код животиња на исхрани богатој фруктозом у комбинацији са хроничним стресом. Резултати анализе липидног метаболизма у скелетним мишићима који указују да након излагања комбинацији третмана долази до транспорта липида из циркулације у скелетне мишиће, стимулисане липолизе и β-оксидације масних киселина, дискутовани су у последњем одељку Дискусије. У овом делу је анализиран и утицај детектованих промена липидног метаболизма на појаву и развој инфламације у скелетним мишићима животиња излаганих комбинацији третмана.

У поглављу **Закључци**, на основу добијених резултата, кандидат је извео следеће закључке:

1. Исхрана богата фруктозом у комбинацији са стресом повећала је енергетски унос и довела до измењене експресије орексигеног неуропептида AgRP и анорексигеног неуропептида POMC у хипоталамусу
2. Комбинација исхране богате фруктозом и хроничног стреса довела је до поремећаја инсулинског сигналног пута у хипоталамусу, судећи по смањеном новоу активних форми протеина Akt и повећаном нивоу ERK и АМПК, као и по повећању протеинског нивоа PTP1B, главног инхибитора инсулинске сигнализације.

3. Исхрана богата фруктозом и хронични стрес примењени заједно повећали су ниво транспортера липида који омогућавају улазак липида у мишиће, повећавају експресију главног ензима липолизе као и транспортера масних киселина у митохондрије који је важан молекул у регулације  $\beta$ -оксидације масних киселина.
4. Комбинација третмана је повећала ниво проинфламаторног регулатора транскрипције NF $\kappa$ B и проинфламаторног цитокина TNF $\alpha$  доводећи до инфламације у скелетним мишићима
5. На основу смањења експресије GR-а и гена *Klf15* који се налази под његовом директном регулацијом, као и повећања нивоа протеина FKBP51, инхибитора GR-а, процењено је да је комбинација третмана компромитовала глукокортикоидну сигнализацију у скелетним мишићима
6. Комбинација исхране богате фруктозом и хроничног стреса довела је до инхибиције сигналног пута инсулина у скелетним мишићима. Смањила је ниво протеина IRS1 и Akt као и протеинске нивое њихових активирајућих фосфорилисаних форми, повећала је однос негативне фосфорилације IRS1 на серинском остатку 307 према укупном IRS1 и повећала протеински ниво PTP1B, инхибитора инсулинске сигнализације.

На основу приказаних резултата и њихове анализе у односу на литературне податке, изведен је општи закључак да је комбинација исхране богате фруктозом и хроничне изложености стресу имала више штетних ефеката на метаболичку хомеостазу хипоталамуса и скелетних мишића мужјака пацова соја Вистар него сваки од третмана примењених посебно.

Поглавље **Литература** садржи листу од 251 библиографске јединице. Референце се односе на истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију, адекватно су цитиране и објашњавају добијене резултате.

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

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

1. **Shirif AZ**, Kovačević S, Brkljačić J, Teofilović A, Elaković I, Djordjevic A, Matić G. Decreased Glucocorticoid Signaling Potentiates Lipid-Induced Inflammation and Contributes to Insulin Resistance in the Skeletal Muscle of Fructose-Fed Male Rats Exposed to Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(13):7206. **M21** <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/7206>

2. **Shirif AZ**, Kovačević S, Bursać B, Lakić I, Veličković N, Jevdjović T, Djordjevic A. Combination of chronic stress with fructose diet increases AMP activated protein kinase phosphorylation and affects agoutirelated protein and proopiomelanocortin expression in the hypothalamus of male Wistar rats. *Acta Biochimica Polonica* 2022. 69(3):647–655. **M23** <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/6075/5392>

### Провера оригиналности докторске дисертације

На основу налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације кандидата Abdulbaset Zidane Shirif-a под називом „Интеракције сигналних путева инсулина, лептина и глукокортикоида у хипоталамусу и скелетном мишићу пацова током метаболичких поремећаја изазваних исхраном обogaћеном фруктозом и стресом“ („*Cross-talk of insulin, leptin and glucocorticoid signaling in the rat hypothalamus and skeletal muscle during metabolic disturbances induced by dietary fructose and stress*“), утврђен је проценат подударности од 31%. Овај степен подударности последица је подударња афилијација кандидата, ментора и чланова Комисије; имена аутора, година и других библиографских података у коришћеној литератури (нпр. „Mauger and Belsham“, „et al., 2009“); назива гена, протеина, биолошких врста, хемијских једињења; симбола којима се означавају гени и протеини; назива коришћених метода; симбола којима се обележавају статистичке значајности, појединих детаља стандардних експерименталних процедура, као што су састави инкубационих смеша и раствора, температурни услови метода, брзине и дужина трајања одређених процедура; делова реченица који сами за себе немају смисао (нпр. „резултати ове докторске дисертације“, „резултати су приказани као средња вредност“, „на основу добијених резултата може се закључити“ и сл.); случајне синтагме (нпр. „након исхране“, „обogaћена фруктозом“, „скелетни мишићи“, „хронични стрес“, „метаболичке промене изазивају“ и сл.); као и текста Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу које су неизоставни део тезе и чији је текст дефинисан од стране матичног факултета.

Када се све изнето узме у обзир, степен подударња је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и извештај указује на оригиналност докторске дисертације.

## Мишљење и предлог Комисије

На основу анализе докторске дисертације кандидата **Abdulbaset Z. Shirif-a**, под насловом „**Интеракције сигналних путева инсулина, лептина и глукокортикоида у хипоталамусу и скелетном мишићу пацова током метаболичких поремећаја изазваних исхраном обогаћеном фруктозом и стресом**“ (*„Cross-talk of insulin, leptin and glucocorticoid signaling in the rat hypothalamus and skeletal muscle during metabolic disturbances induced by dietary fructose and stress“*), Комисија закључује да резултати представљају значајан допринос у области молекуларне ендокринологије и да доприносе разумевању утицаја сигналних путева инсулина, лептина и глукокортикоида на развој метаболичких поремећаја у хипоталамусу и скелетним мишићима након исхране обогаћене фруктозом и/или излагања хроничном непредвидивом стресу. С обзиром да је преваленца болести повезаних са савременим начином живота, као што су дијабетес типа 2, гојазност и кардиоваскуларне болести, у константном порасту и да негативно утиче на здравље значајног дела светског становништва, расветљавање молекуларних механизма метаболичких поремећаја који се налазе у основи ових болести је од великог значаја за разумевање њихове патофизиологије, као и за развој нових терапија.

Имајући у виду истраживачку активност кандидата и значај постигнутих резултата, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Универзитета у Београду-Биолошког факултета да прихвати овај Извештај и одобри **Abdulbaset Z. Shirif-u** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Интеракције сигналних путева инсулина, лептина и глукокортикоида у хипоталамусу и скелетном мишићу пацова током метаболичких поремећаја изазваних исхраном обогаћеном фруктозом и стресом**“ (*„Cross-talk of insulin, leptin and glucocorticoid signaling in the rat hypothalamus and skeletal muscle during metabolic disturbances induced by dietary fructose and stress“*).

**КОМИСИЈА:**

У Београду 26.01.2023. године

---

др Ана Ђорђевић, научни саветник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-  
Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

---

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

---

др Снежана Којић, научни саветник  
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду