

**Наставно-научном већу
Хемијског факултета
Универзитета у Београду**

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације **Иване Д. Перић**.

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета, Универзитета у Београду, одржаној 09. новембра 2017. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације **Иване Д. Перић**, под називом:

„Испитивање биохемијских основа депресије и механизма деловања антидепресива применом протеомске и метаболомске анализе у хипокампусу пацова изложених хроничној изолацији”

На основу пружене документације подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Ивана Д. Перић је рођена 05. јула 1989. године у Сарајеву, Босна и Херцеговина. Основну школу „Вук Караџић“ и гимназију „Филип Вишњић“ завршила је у Бијељини. Хемијски факултет Универзитета у Београду, одсек Биохемија, уписује 2007. године. Дипломирала је 2013. године са просечном оценом 8,52. Исте године на студијском програму биохемија уписује мастер студије и завршава одбраном мастер тезе 2014. године са просечном оценом 10. Докторске студије на Хемијском факултету уписује школске 2014/15. године. Од јула 2015. године запослена је као истраживач приправник на Институту за нуклеарне науке „Винча“ у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Молекуларни механизми патофизиолошких промена у ћелијама централног нервног система и периферног ткива код сисара“ (број пројекта 173044). Члан је Биохемијског друштва Србије од 2007. године.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Ивана Д. Перић је коаутор три научна рада публикована у реномираним међународним часописима, по једног из категорија M21, M22 и M23, као и коаутор три саопштења штампана у целини и два саопштења штампана у изводима на скуповима међународног значаја.

Целокупна библиографија Кандидата, према критеријумима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, дата је у Прилогу овог извештаја.

В. Образложење теме

1. Научна област: Биохемија

Ужа научна област: Неурохемија

2. Предмет рада:

Предложена тема кандидата Иване Д. Перић заснива се на протеомској и метаболомској анализи фракција/целокупног лизата хипокампуса мужјака пацова соја Wistar, који су претходно изложени хроничној социјалној изолацији, као стандардном животињском моделу депресије, у циљу проналажења додатних механизма који су у основи понашања сличног депресији и анксиозности код људи. Хипокампус је моздани регион који учествује у регулацији одговора организма на стрес, и његова регулаторна улога је нарушена (и) у животињском моделу депресије.

Кандидат ће испитати и биохемијске основе антидепресивног ефекта хроничне примене изабраних лекова супротног основног механизма деловања (флуоксетин и тианептин), поређењем промена у протеомским и метаболомским обрасцима фракција/целокупног лизата хипокампуса. Детаљније сагледавање механизма којима социјална изолација доводи до настанка понашања налик депресији би допринело бољем разумевању овог комплексном и непотпуно проученог поремећаја понашања, док би обухватније дефинисање пострецепторских процеса деловања изабраних антидепресива омогућило проналажење нових молекулских мета њиховог деловања. Стога би резултати ове докторске дисертације могли да имају и примењени (терапијски) значај, те буду од користи у стварању нових лекова побољшане делотворности.

3. Научни циљ истраживања:

Циљ ове докторске дисертације је да се идентификују промене у нивоима специфичних протеина и метаболита као делова (специјализованих) биохемијских путева чије је (нормално) функционисање промењено у условима хроничне изолације и/или као последица хроничног третмана антидепресивима. Даље, истраживања у оквиру ове докторске дисертације обухватиће испитивања сличности и разлика у пострецепторски активираним (сигналним) путевима од стране изабраних антидепресива, што ће допринети разумевању (сложених) молекулских механизмима њиховог терапеутског деловања.

4. Методе истраживања:

У експериментима је предвиђено коришћење одраслих пацова соја Wistar, који ће у стандардним условима бити узгајани у виваријуму Института за нуклеарне науке „Винча“, Лабораторије за молекуларну биологију и ендокринологију. Рад са лабораторијским животињама биће у складу са прописаним етичким нормама и директивама. У прилогу овог извештаја је достављена етичка дозвола, издата од стране Етичке комисије за употребу лабораторијских животиња Института за нуклеарне науке „Винча“, која прати смернице „Српског удружења за употребу животиња у истраживању и образовању“ (СЛАСА), лиценца 323-07-01893/2015-05. Она даје одобрење Кандидату за спровођење експеримената на животињама, уз приложен сертификат о положеној обуци из предмета „Наука о лабораторијским животињама“.

За увођење животиња у понашање налик депресији биће искоришћен стандардни животињски модел депресије, који подразумева излагање пацова хроничном стресу социјалне изолације. На почетку експеримента, пацови (n=24) старости два месеца биће подељени у четири, по броју животиња једнаке експерименталне групе: две контролне (кавези са по 4 јединке) и две подвргнуте социјалној изолацији (појединачно смештање животиња у кавезе, уз одсуство било каквог тактилног и визуелног контакта са другим јединкама) током шест (3+3) недеља укупног трајања експеримента. Друге три недеље експеримента, по једна контролна и социјално изолована група животиња биће третирана антидепресивима. Третман лековима подразумеваће, на дневној бази, интраперитонеалну ињекцију флуоксетин-хидрохлорида (15 mg/kg телесне масе) или тианептина (10 mg/kg телесне масе), док ће преостале две групе животиња примати физиолошки раствор.

Одабране дозе лекова узрокују концентрације лекова у серуму пацова које одговарају онима нађеним у серуму људи хронично третираним овим антидепресивима.

Тестови понашања (тест преференције ка сахарози и закопавање кликера) ће бити искоришћени као критеријум за процену утицаја хроничног стреса социјалне изолације и третмана антидепресивима на развијање депресивног понашања, које се код пацова манифестује кроз анхедонију и анксиозност. Ови тестови ће бити изведени на почетку експеримента, на крају треће недеље (дакле пре почетка третмана антидепресивима) и на крају шесте недеље.

Пацови ће након шест недеља експеримента бити анестезирани комбинацијом два анестетика (кетамин и ксилазид), перфундовани физиолошким раствором и жртвовани декапитацијом. Након тога, биће узорковани хипокампуси, чијим ће се ћелијским фракционисањем (на Перкол градијенту) добити фракције цитосола и несинаптичких митохондрија. Потврда чистоће ових фракција биће урађена применом Western blot-а, детекцијом специфично локализованих протеина. Ове две фракције ће бити полазни материјал за компаративну протеомску студију, применом једнодимензионалне натријум-додецилсулфат полиакриламидне гел електрофорезе (SDS-PAGE), праћене течном хроматографијом са масеним детектором. Наиме, несинаптичке митохондрије су структуре које осликавају промене на нивоу експресије протеина, као једног од механизма прилагођавања ћелије на (хроничну) изложеност стресу или (одложене) терапеутске ефекте антидепресива. У циљу карактеризације екстракта лизата хипокампуса биће обављена инструментална анализа употребом свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије са масеним детектором.

Статистичка обрада података из тестова понашања биће урађена помоћу двофакторске анализе варијансе са поновљеним мерењем, праћене Duncan post-hoc тестом, коришћењем програма Statistica 10. За (сложене) анализе резултата протеомске и метаболомске студије биће употребљени доступни биоинформатички алати.

5. Актуелност проблематике:

Вишедеценијска истраживања дала су значајан допринос у разумевању депресије, иако свеобухватни биохемијски механизми њеног настанка, као и ефеката фармаколошког третмана применом антидепресива, и даље нису потпуно познати. Према подацима

Светске здравствене организације, на Земљи тренутно живи око 300 милиона људи оболелих од депресије, а процене су да ће до 2020. године депресија бити друго водеће патофизиолошко стање. Овај хронични или рекурентни облик поремећаја понашања има изузетно комплексну етиологију, са биолошком, социолошком и психолошком компонентом, као и сложену симптоматологију. Социјална изолација се показала као један од кључних фактора који доприносе развоју депресије, недовољно познатим механизмима на молекулском нивоу.

Већина антидепресива који се данас користе у клиничкој пракси функционишу на принципу моноаминске хипотезе депресије: они (селективно) делују на одговарајуће рецепторе и ензиме у мозгу, повећавајући (у болести снижену) концентрацију једног или више моноамина. Флуоксетин (N-Methyl-3-(p-trifluoromethylphenoxy)-3-phenylpropylamine) је најчешће преписивани антидепресив из групе "селективних инхибитора поновног преузимања серотонина", који, инхибирајући рецепторе на пресинаптичким неуронима, повећавају ниво серотонина у мозгу. Тианептин (7-[(3-Chloro-6-methyl-5,5-dioxido-6,11-dihydrodibenzo[c,f][1,2]thiazepin-11-yl)amino]heptanoic acid), антидепресив из групе "селективних стимулатора преузимања серотонина" је структурно сличан трицикличним антидепресивима. С обзиром да (основни) механизам његовог деловања подразумева стимулисање преузимања серотонина од стране рецептора из синаптичке пукотине у пресинаптичке неуроне, сврстава се у атипичне антидепресиве. Према томе, ова два антидепресива имају међусобно супротни утицај на рецепторе поновног преузимања серотонина.

Иако је ефикасност коришћења антидепресива код пацијената са депресијом несумњиво утврђена, и даље нису јасне молекулске основе разлика између времена потребног да се испоље њихови (први) терапеутски ефекти (обично неколико недеља, тј. захтева хроничну примену лека) и времена за које се ниво моноамина у мозгу стабилизује (обично неколико сати од почетка терапије). Због тога се новија истраживања на пољу депресије све више усмеравају на проналажење ћелијских механизма мимо синапси и (директног) утицаја на ниво моноамина у мозгу, тј. на процесе прилагођавања ћелија на третман леком који су одговорни за његове одложене терапијске ефекте. У склопу ових истраживања све већи значај има примена „omic's“ техника, пре свега протеомикса и метаболомикса. Праћење промена на нивоу експресије протеина и концентрације

(кључних) биомолекула/метаболита омогућава идентификацију (могућих) биохемијских путева и процеса од значаја за развој болести и (ефикасну) терапију. Интегративне студије протеомикса и метаболомикса би објединиле и друге не-моноаминске факторе који се повезују са депресијом, и тако допринеле разумевању мултифакторијалне природе депресије и њених клиничких варијација, као и деловања антидепресива.

До данас није урађена обједињена студија протеомске и свеобухватне метаболомске анализе на примеру хроничног стреса социјалне изолације као етиолошког фактора настанка понашања налик депресији, нити на примеру упоредног испитивања деловања антидепресива супротног (основног) механизма деловања, што је (општи) предмет истраживања у овој докторској дисертацији.

6. Очекивани резултати:

Резултати ове докторске дисертације би требало да допринесу бољем разумевању молекулских фактора који су у основи утицаја хроничног стреса социјалне изолације на појаву понашања сличног депресији код пацова, као и антидепресивног ефекта хроничне употребе флуоксетина и тианептина, свеобухватном анализом података прикупљених у протеомској и метаболомској студији.

Конкретније, очекује се:

- откривање ћелијских процеса и његових протеинских компоненти, детекцијом промењене експресије релевантних протеина у хипокампусу пацова;
- откривање биохемијских путева и његових кључних метаболита, детекцијом промене нивоа метаболита у хипокампусу пацова.

Г. Закључак

Мишљења смо да се планирана истраживања уклапају у савремене токове истраживања у области биохемије и неуронауке. Идентификација биохемијских путева у основи депресивног понашања и хроничног деловања различитих антидепресива је од великог значаја за будућа истраживања патобиохемије овог недовољно испитаног психијатријског поремећаја, као и ефикасног терапијског (фармаколошког) приступа. Утврђивање промена у метаболичким путевима у условима депресивног понашања и деловања антидепресива је од изузетног значаја и за дефинисање биомаркера депресије,

што би могло бити од користи у стварању нових лекова (још) успешнијег терапеутског деловања.

У складу са Статутом Хемијског факултета, и с обзиром на до сада објављене научне радове, сматрамо да кандидат Ивана Перић испуњава све потребне услове за одобравање израде докторске дисертације. Сагласно томе, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета да се Ивани Д. Перић одобри израда докторске дисертације: **„Испитивање биохемијских основа депресије и механизма деловања антидепресива применом протеомске и метаболомске анализе у хипокампусу пацова изложених хроничној изолацији“**.

За менторе се предлажу др Драгана Филиповић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча” и др Милан Николић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду.

Београд, 01. децембар 2017. год.

Комисија:

др Драгана М. Филиповић, виши научни сарадник,
Институт за нуклеарне науке „Винча“

др Милан Р. Николић, доцент,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Владимир П. Бешкоски, ванредни професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Прилог:

Библиографија Кандидата, категорисана према критеријумима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије:

M21: Радови објављени у врхунским часописима међународног значаја

1. Perić I, Stanisavljević A, Gass P, Filipović D. Fluoxetine reverses behavior changes in socially isolated rats: role of the hippocampal GSH-dependent defense system and proinflammatory cytokines. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2017, 267(13):737-749. M21, IF₂₀₁₅ 4.113.

M22: Радови објављени у истакнутим часописима међународног значаја

1. Filipović D, Costina V, Perić I, Stanisavljević A, Findeisen P. Chronic fluoxetine treatment directs energy metabolism towards the citric acid cycle and oxidative phosphorylation in rat hippocampal nonsynaptic mitochondria. *Brain Res*, 2017, 1659(4): 41-54. M22, IF₂₀₁₆ 2.746.

M23: Радови објављени у часописима међународног значаја

1. Stanisavljevic A, Peric I, Pantelic M, Filipovic DM. Olanzapine alleviates oxidative stress in the liver of socially isolated rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(7): 634-640. M23, IF₂₀₁₆ 1.822.

M 33: Радови саопштени на скупу међународног значаја штампани у целини

1. Perić I, Todorović N, Stanisavljević A, Đorđević N, Filipović D. The effects of fluoxetine on hippocampal antioxidative defense in depressive-like rats. *Physical Chemistry 2016*, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 2016, 4: 435-438.
2. Stanisavljević A, Perić I, Todorović N, Đorđević N, Filipović D. Olanzapine intensifies lipid peroxidation and modulates catalase activity in liver of social isolated rats. *Physical Chemistry 2016*, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 2016, 4: 439-442.
3. Đorđević N, Perić I, Stanisavljević A, Todorović, N, Filipović D. Duloxetine enhances hepatic GSH-dependent defense in rats. *Physical Chemistry 2016*, 13th International

Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 2016, 4:443-446.

M34: Радови саопштени на скупу међународног значаја штампани у изводу

1. Perić I, Filipović D, Costina V, Findeisen P. Chronic Treatment with Fluoxetine Led to Alterations in the Rat Hippocampal Proteome. Belgrade Bioinformatics Conference 2016, Belgrade, Book of Abstracts, 2016, 128.
2. Beškoski VP, Perić I, Gojgić-Cvijović G, Slavković Beškoski L, Dojčinović B, Vrvic MM. Leaching of Arsenic from Tailings by Microbially Produced Rhamnolipids. 23rd Symposium on Environmental Chemistry, Kyoto, Abstracts CD, 2014, 298-299.