

Биолошки факултет
Број захтева: 50/137-1
Датум: 14. 6. 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Антифероптогски потенцијал природних и синтетских донора водоник-сулфида у анималном моделу дијабетеса”

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Невена Н. Савић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

3. Година дипломирања: 2020.

4. Година уписа на докторске студије: 2021/2022.

Универзитет у Београду - Биолошки факултет

5. Назив студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Анимална и хумана физиологија.

подношења пријаве теме докторске дисертације: 29. 4. 2024.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

А:

Име и презиме ментора: **др Весна Оташевић,**

Звање: научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Markelic M, Stancic A, Saksida T, Grigorov I, Micanovic D, Velickovic K, Martinovic V, Savic N, Gudelj A, **Otasevic V**. Defining the ferroptotic phenotype of beta cells in type 1 diabetes and its inhibition as a potential antidiabetic strategy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023, 3;14:1227498.
2. Stancic A, Velickovic K, Markelic M, Grigorov I, Saksida T, Savic N, Vucetic M, Martinovic V, Ivanovic A, **Otasevic V**. Involvement of Ferroptosis in Diabetes-Induced Liver Pathology. *Int J Mol Sci*. 2022, 18;23(16):9309.
3. Stancic A, Saksida T, Markelic M, Vucetic M, Grigorov I, Martinovic V, Gajic D, Ivanovic A, Velickovic K, Savic N, **Otasevic V**. Ferroptosis as a Novel Determinant of β -Cell Death in Diabetic Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2022, 14;2022:3873420.
4. Korac A, Srdic-Galic B, Kalezic A, Stancic A, **Otasevic V**, Korac B, Jankovic A. Adipokine signatures of subcutaneous and visceral abdominal fat in normal-weight and obese women with different metabolic profiles. *Arch Med Sci*. 2021, 26;17:323-336.
5. Kalezic A, Macanovic B, Garalejic E, Korac A, **Otasevic V**, Korac B. Level of NO/nitrite and 3-nitrotyrosine in seminal plasma of infertile men: Correlation with sperm number, motility and morphology. *Chem Biol Interact*. 2018, 1;291:264-270.

Б:

Име и презиме ментора: **др Ксенија Величковић,**

Звање: доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Dakic T, **Velickovic K**, Lakic I, Ruzicic A, Milicevic A, Plackic N, Vujovic P, Jevdjovic T. Rat brown adipose tissue thermogenic markers are modulated by estrous cycle phases and short-term fasting. *Biofactors*. 2024, 50(1):101-113.

2. **Velickovic K**, Leija HAL, Kosic B, Sacks H, Symonds ME, Sottile V. Leptin deficiency impairs adipogenesis and browning response in mouse mesenchymal progenitors. *Eur J Cell Biol.* 2023, 102(3):151342.
3. Stancic A, Saksida T, Markelic M, Vucetic M, Grigorov I, Martinovic V, Gajic D, Ivanovic A, **Velickovic K**, Savic N, Otasevic V. Ferroptosis as a Novel Determinant of β -Cell Death in Diabetic Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2022, 14;2022:3873420.
4. Stancic A, **Velickovic K**, Markelic M, Grigorov I, Saksida T, Savic N, Vucetic M, Martinovic V, Ivanovic A, Otasevic V. Involvement of Ferroptosis in Diabetes-Induced Liver Pathology. *Int J Mol Sci.* 2022, 18;23(16):9309.
5. **Velickovic K**, Ukropina M, Glisic R, Cakic-Milosevic M. Effects of long-term sucrose overfeeding on rat brown adipose tissue: a structural and immunohistochemical study. *J Exp Biol.* 2018, 10;221(Pt 9).

Наведени радови кандидата на којима су и ментори аутори, нису радови из докторске дисертације кандидата.

Обавештамо вас да је Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Биолошког факултета, на седници одржаној 14. 6. 2024. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.
3. Електронска верзија
4. Потврда Етичке комисије



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

50/137 - 14. 6. 2024.

На основу члана 96. Закона о високом образовању, члана 62. став 1. тачка 12. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 29. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, бр: 15/276 од 07.09.2018; 15/122 од 14.06.2019.; 15/132 од 11.09.2020. године., Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 14. 6. 2024. године, донело је

О Д Л У К У

о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора

На основу Извештаја Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације прихвата се тема докторске дисертације и одређује ментор кандидату:

Невени Н. Савић, мастер биолог, студијског програма докторских студија:
Молекуларна биологија, модул: Анимална и хумана физиологија, под називом:

„Антифероптотски потенцијал природних и синтетских донора водоник-сулфида у анималном моделу дијабетеса”

За менторе се одређују:

1. др Весна Оташевић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију,
2. др Ксенија Величковић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета

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

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 13. 5. 2024. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Невене Н. Савић**, под насловом: „Испитивање антифероптозског потенцијала природних и синтетских донора водоник-сулфида у анималном моделу дијабетеса“.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад Невене Н. Савић Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Невена Н. Савић

Датум и место рођења: 5.6.1996., Београд, Р. Србија

Образовање:

2021. – данас Докторске академске студије, Студијски програм Молекуларна биологија (модул Анимална и хумана физиологија), Биолошки факултет, Универзитет у Београду;

2020. – 2021. Мастер биолог (Студијски програм Биологија, Експериментална физиологија животиња и човека), Биолошки факултет, Универзитет у Београду;

2015. – 2020. Дипломирани биолог (Студијски програм Биологија), Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

Запослење:

2021. – данас истраживач-приправник; Одељење за Молекуларну биологију, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет Београду.

Курсеви:

Пројекти:

1. Ангажована на пројекту Фонда за науку Републике Србије у оквиру Програма ПРИЗМА, под називом „Targeting ferroptosis in diabetes and diabetic complications by hydrogen (per) sulfide“ под руководством др Весне Оташевић (2024 - данас);

2. Програм рада ИБИСС-а за 2022. годину, Министарство просвете, науке и технологије Републике Србије бр. 451-03-68/2022-14/200007;

3. Програм рада ИБИСС-а за 2023. годину, Министарство науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије бр. 451-03-47/2023-01/200007;

4. Програм рада ИБИСС-а за 2021. годину, Министарство просвете, науке и технологије Републике Србије бр. 451-03-9/2021-14/200007.

Чланство у научним друштвима:

Српско биолошко друштво (СБД)

Страни језици:

Енглески језик – напредан ниво;

Руски језик – почетни ниво.

Посебне активности и награде:

/

Б) Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Markelic M, Stancic A, Saksida T, Grigorov I, Micanovic D, Velickovic K, Martinovic V, **Savic N**, Gudelj A, Otasevic V. Defining the ferroptotic phenotype of beta cells in type 1 diabetes and its inhibition as a potential antidiabetic strategy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023, 3;14:1227498. (M21)

2. Stancic A, Velickovic K, Markelic M, Grigorov I, Saksida T, **Savic N**, Vucetic M, Martinovic V, Ivanovic A, Otasevic V. Involvement of Ferroptosis in Diabetes-Induced Liver Pathology. *Int J Mol Sci*. 2022, 18;23(16):9309. (M21)

3. Stancic A, Saksida T, Markelic M, Vucetic M, Grigorov I, Martinovic V, Gajic D, Ivanovic A, Velickovic K, **Savic N**, Otasevic V. Ferroptosis as a Novel Determinant of β -Cell Death in Diabetic Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2022, 14;2022:3873420. (M21)

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

/

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у целости

/

Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. Stančić A., Otašević V., Markelić M., Veličković K., Gudelj A., **Savić N.**, Martinović V., & Grigorov I. (2023). Antiferroptotic approach for the treatment of diabetes-induced liver pathology: the effects of ethyl pyruvate. In *EMBO Workshop: Ferroptosis: When metabolism meets cell death; 2023 Apr 23-27; Seeon, Germany* (p. 92).

2. Veličković K., Markelić M., Stančić A., Otašević V., Gudelj A., **Savić N.**, Martinović V., & Grigorov I. (2023). Diet-and age-dependent changes of intestinal injury in rats. In *Biochemistry in Biotechnology: Serbian Biochemical Society, Twelfth Conference, International scientific meeting; 2023 Sep 21-23; Belgrade, Serbia* (p. 80).

Б5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Savić, N.**, Otašević, V., Saksida, T., Markelić, M., Grigorov, I., Veličković, K., Martinović V., Mićanović D., Ivanović A., & Stančić, A. (2022). Допринос фероптозе патолошким променама јетре дијабетичних мишева. *Knjiga sažetaka: Treći Kongres biologa Srbije: Osnovna i primenjena istraživanja: Metodika nastave; 2022 Sep 21-25; Zlatibor, Serbia.*

2. Otašević V., Saksida T., Markelić M., Grigorov I., Vučetić M., Veličković K., Martinović V., Gajić D., Ivanović A., **Savić N.**, & Stančić A. (2022). Ferroptaza u dijabetesu i dijabetičnim komplikacijama. *Knjiga sažetaka: Treći Kongres biologa Srbije: Osnovna i primenjena istraživanja: Metodika nastave; 2022 Sep 21-25; Zlatibor, Serbia.*

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

„Антифероптотски потенцијал природних и синтетских донора водоник-сулфида у анималном моделу дијабетеса”

Полазне основе:

Дијабетес је метаболичко обољење хроничног карактера чију инциденцу карактерише епидемиолошки раст [1]. Према процени Међународне федерације за дијабетес од ове болести је данас у свету оболело 537 милиона људи, што чини скоро 10% светске адултне популације [1]. Хипергликемија је главна карактеристика дијабетеса и услед своје хроничне природе узрок је даљих, секундарних дијабетичних компликација на различитим органима. Управо такве патолошке промене су главни узрок повећаног ризика од смртног исхода оболелих од дијабетеса. Светска здравствена организација је уврстила дијабетес међу десет водећих узрочника смрти у свету [2]. Алармантно повећање инциденце дијабетеса, спрегнуто са актуелном терапијом која се своди на лечење већ постојећих патолошких промена, и не решава суштински узрок болести, јасно указује на ургентну потребу за проналажењем нових терапијских приступа за превенцију и лечење дијабетеса.

Познато је да је кључни догађај у етиологији дијабетеса прогресивно умирање β -ћелија панкреаса, док даљи развој болести прате патолошке промене на другим органима, узроковане умирањем ћелија ткива погођених болешћу [3]. Стога је један од најбитнијих праваца у лечењу дијабетеса фокусиран на проналажење терапијских приступа којим би се супримирао ћелијска смрт. Данас је познато да су у етиологију и развој дијабетеса укључени различити типови ћелијске смрти попут апоптозе, некрозе, аутофагије, а од недавно и фероптоза [3,4]. Наиме, фероптоза је у науци релативно скоро дефинисана, 2012. године, и интензивно се ради на испитивању њеног значаја у различитим патологијама [5]. Наш тим је недавно показао улогу фероптозе у умирању и смањењу функционалне популације β -ћелија у дијабетогеним условима [3], као и у развоју дијабетичних компликација јетре [6].

Фероптоза је регулисана, програмирана ћелијска смрт до које долази услед неадекватног одговора ћелије на интензиван процес липидне пероксидације зависне од гвожђа [5]. С једне стране карактеристика фероптозе је акумулација слободног унутарћелијског гвожђа, које услед своје високо реактивне природе започиње Фентонову реакцију чији су крајњи продукти реактивне врсте кисеоника. Међу њима настаје и веома потентан иницијатор липидне пероксидације – хидроксил радикал који започиње ланчану реакцију липидне пероксидације на ћелијској мембрани. Показано је да акумулација унутарћелијског гвожђа карактеристична за фероптозу настаје услед измењене регулације протеина који у организму регулишу ниво слободног (реактивног) гвожђа. Наиме, повећан капацитет за унос гвожђа спрегнут са смањеним капацитетом ћелија за складиштење и избацивање вишка гвожђа, доприноси таложењу гвожђа и на тај начин иницирању процеса фероптозе [5]. Унутарћелијско нагомилавање гвожђа такође је карактеристично и за дијабетес [7]. Студије су показале да компликације изазване дијабетесом карактеришу повећана акумулација гвожђа и липидна пероксидација, односно догађаји кључни за иницирање фероптозе [7].

С друге стране фероптозу поред повећане акумулације липидних пероксида карактерише и смањен капацитет ћелија за адекватно уклањање истих услед дисфункције глутатион-пероксидазе 4 (енг. *glutathione-peroxidase 4*; GPX4), једине изоформе из фамилије глутатион-пероксидаза која у ћелији уклања липидне пероксиде [3]. GPX4 је део ширег система/осе која обухвата цистеин-глутаматни антипортер (енг. *cystine-glutamate antiporter system*; xCT) и редуковани глутатион (GSH) и чија је смањена функција такође карактеристика фероптозе [5]. xCT је мембрански транспортни протеин чији низак ниво доводи до смањеног уноса цистеина, а последично и укупне количине GSH, с обзиром на то да је цистеин једна од три аминокиселинске компоненте GSH [5]. GSH чини важну антиоксидативну компоненту ћелије, а с аспекта фероптозе посебно је значајан, јер функционише као кофактор GPX4 у реакцији уклањања липидних пероксида. Тиме, смањен укупан ниво GSH у ћелији, и/или протеински садржај или активност GPX4 за последицу има неадекватну елиминацију липидних пероксида и фероптозу ћелије.

Познато је да дијабетес карактеришу повећани оксидативни стрес и инфламација, који су такође карактеристични и за фероптозу [3,7]. Оксидативни дисбаланс у дијабетесу настаје као последица хипергликемије и хиперлипидемије [3]. Повећана продукција реактивних врста кисеоника је и у дијабетесу праћена slabим антиоксидативним капацитетом ћелија, који се огледа кроз смањену функцију и/или експресију ензима антиоксидативне одбране (АО). Ово све доприноси нарушавању редокс миљеа у ћелијама које карактерише и инактивација редокс-сензитивног транскрипционог регулатора – Nrf2 (енг. *nuclear factor (erythroid-derived-2)-related factor 2*) кључног за активацију АО и антиоксидативног, протективног одговора ћелије [3, 8]. Ми смо недавно показали да је утишан, тј. инактивиран Nrf2 и последично његови нисходни сигнални путеви који поред поменутих обухватају регулацију метаболизма гвожђа и GSH, саставни део фероптотског фенотипа панкреаса и јетре дијабетичних животиња [3,6]. Сагласно томе, активација Nrf2 представља обећавајући приступ за инхибицију фероптозе и последично третман патологија у које је овај тип ћелијске смрти укључен.

Најновији литературни подаци показали су да је у патологијама различитим од дијабетеса могуће супримирати фероптозу дозорима водоник-сулфида (енг. *hydrogen-sulfide*; H₂S) [9]. Описани механизми укључују његову интеракцију са (анти) оксидантима, метаболизмом липида и сигналним путевима повезаним са инфламацијом [10]. Познато је такође да је дијабетес стање које карактерише снижена продукција и ниво H₂S системски и у периферним ткивима [10]. Међутим и даље је непознаница да ли се таргетирањем фероптозе кроз H₂S-зависан сигнални пут може остварити андијабетични ефекат, као и који механизми леже у основи таквог деловања. Првобитно сматран токсичним гасом, H₂S је сада препознат као гасотрансмитер, а његови реактивни метаболити, иначе реактивнији од њега самог, а пре свега полисулфиди и персулфиди, представљају редокс сигналне молекуле који регулишу важне физиолошке процесе путем посттранслационе модификације протеина – персулфидације [10]. Персулфидација је данас у фокусу истраживања и њен значај у смислу преноса сигнала унутар ћелије може се изједначити са фосфорилацијом.

Узимајући у обзир наведен значај фероптозе у етиологији дијабетеса и развоју дијабетичних компликација јетре, као и снижен ниво H₂S карактеристичан за дијабетес, предложено је коришћење различитих природних и синтетских дозора H₂S, у сврху супримирања фероптотске ћелијске смрти и последично спречавања прогресије дијабетеса. Овакав приступ би омогућио утврђивање антифероптотског потенцијала различитих природних и синтетских дозора H₂S и разјаснио механизам њиховог терапијског деловања у дијабетесу, а са крајњим циљем потенцијалне примене ових једињења у терапији дијабетеса.

Предмет докторске дисертације

Анти-фероптотски потенцијал H_2S није лако објаснити, јер је сам H_2S слаб антиоксидативни агенс. Међутим, реактивни метаболити H_2S попут персулфида и полисулфида су моћнији редукујући агенси од матичног H_2S од кога су настали. Узевши у обзир ово, као и да је хемија сулфида до персулфида сложена, јер H_2S егзистира у динамичкој биолошкој равнотежи са својим реактивним врстама, у овој докторској тези предвиђено је коришћење различитих донора H_2S , природних и синтетских, у циљу повећања ћелијског нивоа његових реактивних врста и обезбеђивања што ефикаснијих ефеката H_2S . Предложеном докторском дисертацијом прво ће се тестирати потенцијални антифероптотски ефекат природних и синтетских донора H_2S на смањење инциденце и патолошке прогресије дијабетеса тј. потенцијални протективни ефекат на развој патологије у панкреасу и развој раних дијабетичних компликација у јетри. Донор са најпотентнијим антифероптотским и антидијабетичним ефектом користиће се у експерименталној поставци докторске тезе за испитивање антифероптотског/антидијабетичног ефекта на компликације јетре изазване дијабетесом у касној фази болести.

Научни циљ истраживања

Циљ предложене докторске дисертације је тестирање потенцијалног антифероптотског ефекта различитих природних и синтетских донора H_2S на етиологију дијабетеса, односно на развој дијабетичне патологије панкреаса и развој патолошких промена/дијабетичних компликација јетре.

У ту сврху, у предложеној докторској дисертацији испитиваће се неколико специфичних циљева којима ће се дефинисати:

А) метаболички/функционални статус панкреаса и јетре - у сврху праћења настанка дијабетеса и прогресије болести и то одређивањем:

- инциденце дијабетеса,
- метаболичких параметара који специфично показују функцију панкреаса (глукоза из крви и инсулин из серума), односно јетре (аланин-аминотрансфераза (енг. *alanine aminotransferase*; ALT) и аспартат-аминотрансфераза (енг. *aspartate aminotransferase*; AST) из серума,
- општих метаболичких параметара – нивоа триглицерида и холестерола из серума,
- присуства фиброзе у јетри, односно ожиљног ткива које настаје на месту оштећења ткива изазваних умирањем ћелија, промена у величини панкреасних острваца и присуства инфилтрата имунских ћелија у ткивима од интереса,
- инфламаторних параметара – НМGB1 (енг. *high mobility group box protein 1*), интерлеукин-6 (енг. *interleukin-6*, IL-6) и фактор некрозе тумора- α (енг. *tumor necrosis factor*, TNF- α);

Б) фероптотски фенотип (статус) у ткивима од интереса и то одређивањем:

- нивоа слободног унутарћелијског гвожђа и експресије протеина кључних за метаболизам гвожђа, односно трансферинског рецептора (енг. *transferrin receptor 1*; TFR), феритина (енг. *ferritin heavy chain*; FTH1) и феропортина (енг. *ferroportin 1*; FPN1),
- специфичних крајњих продуката, тј. маркера липидне пероксидације – 4-хидрокси-2-ноненала (енг. *4-hydroxy-2-nonenal*; 4-HNE) и липофусцина,
- ензима АО – супероксид-дисмутазе (енг. *superoxide-dismutase*; SOD), каталазе (енг. *catalase*, CAT), тиоредоксин-редуктазе (енг. *thioredoxin-reductase*; TrxR), укупне глутатион-пероксидазе (енг. *glutathione-peroxidase*; GPX) и глутатион С-трансферазе (енг. *glutathione S-transferase*; GST),
- нивоа GSH и параметара кључних за регулацију метаболизма GSH, односно анализа хСТ, глутатион-синтетазе (енг. *glutathione-synthetase*; GSS), глутамат-цистеин лигазе (енг. *glutamate-cysteine ligase*, GCL), глутатион-редуктазе (енг. *glutathione-reductase*, GR) и GPX4,
- статуса активације редокс-сензитивних транскрипционих фактора, Nrf2 и NF-κB (енг. *nuclear factor kappa B*; NF-κB) анализом њихове ћелијске локализације, као и њихове експресије;

B) параметара метаболизма H₂S у панкреасу и јетри анализом:

- протеина који учествују у синтези и разградњи H₂S, и то цистатион бета-синтазе (енг. *cystathionine β-synthase*; CBS), цистатионазе (енг. *cystathionase*; CTH) и сулфид-хинон оксидо-редуктазе,
- нивоа персулфидације укупних и специфичних протеина што би посредно показало садржај H₂S и његову биолошку активност.

Материјал и методе који се користе

3.1. Експериментални дизајн:

У предложеној докторској дисертацији биће коришћени адултни мужјаци мишева *C57BL/6* соја, који ће током експеримента имати *ad libitum* приступ свежој храни и води и биће гајени под стандардним дневно-ноћним режимом. У циљу испитивања потенцијалног утицаја H₂S на инциденцу и патолошки ток дијабетеса *in vivo* и повезаности тих ефеката са фероптозом у релевантним ткивима (ендокрини панкреас, јетра), у овој студији ће се примењивати два приступа. Први приступ подразумева третман животиња истовремено са индукцијом дијабетеса, тачније са првом дозом стрептозотоцина (СТЗ) (ко-третман). У том експерименталном приступу, фокус ће бити на етиологији тј. настанку болести, те ће се пратити промене на панкреасу, као и ране промене на јетри, а индукција дијабетеса ће се вршити интраперитонеалним инјектирањем пет ниских доза СТЗ, (40 mg/kg/дневно) [6]. Донори H₂S инјектираће се интраперитонеално три сата након инјекције СТЗ како би се избегле потенцијалне интерференције, током три недеље. У овом

експерименталном моделу ће се истовремено вршити скрининг и дефинисање донора са најбољим анти-фероптотским потенцијалом. У ту сврху испитиваће се ефекти једног природног (сулфорафан, 1-isothiocyanato-4-[methylsulfinyl] butane, једињење богато сумпором које се налази у купусастом поврћу) и три синтетска H_2S донора: 1) (p-methoxyphenyl)morpholino-phosphinodithioic acid, GYY4137, 2) натријум сулфид, Na_2S_4 3) цистеин 3 сулфид, Cys-S3. На основу ових експеримената, одабраће се донор са најпотентнијим антифероптотским, тј. антидијабетичним потенцијалом који ће се користити у другом експерименталном моделу у наставку студије. Други приступ, тј. експериментални модел се базира на примени донора H_2S у контексту терапије касних дијабетичних компликација у јетри, те ће третман животиња донором отпочети тек по развоју компликација. У ту сврху, изабрани донор ће се користити за испитивање потенцијалног протективног ефекта H_2S и његових реактивних врста код дијабетичних компликација јетре у касним фазама дијабетеса. У овом експерименту животиње ће се третирати два месеца по индукцији дијабетеса да би се омогућио развој болести и испитао ефекат донора на касну, већ развијену патологију у јетри, током четири недеље (пост-третман).

У случају ко-третмана и пост-третмана животиње ће бити подељене у групе од по осам животиња, а) контрола (K), б) дијабетична група (D), в) недијабетична група која прима одговарајући донор (K+Dx) и дијабетична група која прима одговарајући донор (D+Dx). У циљу потврђивања антифероптотског деловања донора H_2S биће успостављена дијабетична група истог броја животиња која ће бити третирана специфичним фармаколошким инхибитором фероптозе – липрокстатином-1 (енг. *liproxtatin-1*; Lip), (D+Lip).

Током трајања експеримената, једном недељно, мериће се глукоза узорковањем крви из репне вене, као и маса животиња. По завршетку експеримента узорковаће се крв из које ће се припремити серум, након чега ће се мишеви жртвовати цервикалном дислокацијом. Потом ће се изоловати органи од интереса, панкреас и јетра. Део панкреаса и јетре непосредно након изолације фиксираће се у различитим фиксативима за потребе хистолошких анализа, док ће се остатак органа чувати на $-80\text{ }^\circ\text{C}$ до даље употребе.

3.2. Експерименталне методе:

а) Спектрофотометријски ће се мерити:

- 1) активност ALT и AST из серума мишева,
- 2) ниво холестерола и триглицерида из серума мишева,
- 3) активност SOD, CAT, GPX, GR, GST и TrxR у лизатима јетре и панкреаса,
- 4) ниво укупног GSH у лизатима јетре и панкреаса.

б) Методом SDS полиакриламидне електрофорезе и имунодетекције протеина (енг. *SDS-PAGE Western blot*) биће одређен релативан ниво протеина и то:

- 1) протеина који чине АО ћелије – SOD, CAT, GR и TrxR,
- 2) протеини метаболизма GSH, односно анализа xCT, GCL, GSS, GR и GPX4,
- 3) протеини метаболизма гвожђа, односно TFR, FTH1 и FPN1,
- 4) тоталне и фофорилисане (активне форме) форме Nrf2 – (енг. *phospho-Nrf2*; pNrf2),
- 5) инфламаторних параметара IL-6 и TNF- α .

в) Методом реверзне транскрипције укупне РНК и квантитативне ланчане реакције полимеразе (енг. *Reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) у ткиву панкреаса и јетре мишева биће одређен релативан ниво информационе РНК: параметара кључних за регулацију фероптозе – GPX4, xCT, FPN, FTH1 и Nrf2.

г) Специфичним микроскопским анализама одређиваће се:

- 1) општа морфологија и изглед панкреаса и јетре,
- 2) степен фиброзе јетре,
- 3) ниво гликогена у јетри,
- 4) ниво слободног гвожђа Пруско-плавим бојењем панкреаса и јетре,
- 5) присуство липофусцина у панкреасу и јетри,
- 6) ниво и локализација маркера липидне пероксидације и инфламације у панкреасу и јетри имунохистохемијском анализом 4-HNE и HMGB1,
- 7) ниво и локализација редокс-сензитивних транскрипционих фактора Nrf2 и NF- κ B.

д) Методом ензимске имуноанализе (енг. *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) биће одређен ниво HMGB1 из ткива.

ђ) Добијени резултати биће обрађени и статистички анализирани одговарајућим статистичким тестовима. Наиме, за испитивање нормалности расподеле користиће се Колмогоров-Смирнов тест. За утврђивање значајности разлике између експерименталних група користиће се једносмерна анализа варијансе (*one-way ANOVA*) у случају параметарске дистрибуције, односно *Kruskal-Wallis*-ов тест у случају непараметарске дистрибуције. Статистички значајном сматраће се вредност p нижа од 0.05 ($p < 0.05$).

Очекивани резултати и научни допринос

Очекујемо да резултати ове докторске дисертације расветле сигналне путеве, тј. молекулске механизме фероптотске смрти β ћелија, као и умирања ћелија у ткиву јетре, која је погођена дијабетичним компликацијама, у циљу побољшања приступа у превенцији и лечењу дијабетеса, управо модулацијом овог типа ћелијске смрти деловањем H₂S и његових реактивних метаболита. Пре свега, резултати ове дисертације омогућиће потпуно нову анти-дијабетичку стратегију, која се заснива на инхибицији фероптозе путем H₂S зависног деловања. С обзиром на алармантни пораст инциденце дијабетеса у читавом свету, иновативност приступа истраживања предвиђених овом докторском

дисертацијом имаће велики утицај на међународну истраживачку заједницу и повећати компетенцију, нарочито у области истраживања дијабетеса и других метаболичких обољења. Шта више, очекујемо да комплексна истраживања сигналах путева фероптозе у специфичним условима дијабетеса пруже нова сазнања о основним механизмима самог процеса фероптозе, што би могло имати огроман значај за биомедицинска истраживања на међународном нивоу. Наиме, откриће молекулских механизма који леже у основи фероптозе може омогућити регулацију/модулацију овог облика ћелијске смрти, што би могло имати велики значај не само у третману дијабетеса, већ и у лечењу различитих патолошких стања и обољења која се карактеришу пропадањем функционалних ћелија, као што су неуродегенеративна (Алцхајмерова и Паркинсонова болест) и кардиоваскуларна обољења (исхемија миокарда), бубрежна слабост и сл.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци)

1. <https://idf.org/>
2. <https://www.who.int/>
3. Stancic, A., Saksida, T., Markelic, M., Vucetic, M., Grigorov, I., Martinovic, V., Gajic D., Ivanovic A., Velickovic, K., Savic, N., & Otasevic, V. (2022). Ferroptosis as a novel determinant of β -cell death in diabetic conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
4. Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Martínez, M. S., Olivar, L. C., Nava, M., Tomey D., Rojas M., Salazar J., Garicano C., & Velasco, M. (2018). Pancreatic beta cell death: novel potential mechanisms in diabetes therapy. *Journal of Diabetes Research*, 2018.
5. Jiang, X., Stockwell, B. R., & Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 22(4), 266-282.
6. Stancic A., Velickovic K., Markelic M., Grigorov I., Saksida T., Savic N., Vucetic M., Martinovic V., Ivanovic A., & Otasevic V. (2022) Involvement of Ferroptosis in Diabetes-Induced Liver Pathology. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 9309
7. Zhao, P., Lv, X., Zhou, Z., Yang, X., Huang, Y., & Liu, J. (2023). Indexes of ferroptosis and iron metabolism were associated with the severity of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1297166.
8. Li, S., Zheng, L., Zhang, J., Liu, X., & Wu, Z. (2021). Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 435-449.
9. Miao, Y., Zhang, S., Liang, Z., Wang, Y., Tian, D., Jin, S., Guo Q., Xue H., Teng X., Xiao L., & Wu, Y. (2023). Hydrogen sulfide ameliorates endothelial dysfunction in aging arteries by regulating ferroptosis. *Nitric Oxide*, 140, 77-90.
10. Bełtowski, J., Wójcicka, G., & Jamroz-Wiśniewska, A. (2018). Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Biochemical pharmacology*, 149, 60-76.

Г. Закључак и предлог:

Након свега наведеног, комисија је мишљења да је кандидат **Невена Н. Савић** својим досадашњим експерименталним радом и усвајањем знања из области, показала завидну компетентност да приступи изради дисертације. На основу анализе пријаве теме докторске дисертације, одговарајућих литературних података који подржавају тему, као и приложене пратеће документације, Комисија закључује да су предмет и циљеви истраживања предложене докторске дисертације **Невене Н. Савић** научно засновани, као и да је предвиђена методологија адекватно одабрана и да ће омогућити испуњавање постављених циљева научног истраживања. Планирана истраживања која се ослањају на супресију дијабетесом-индуковане фероптозе, последично смањење умирања ћелија и пропадање органа погођених дијабетесом, отварају могућност да поменут аспект истраживања буде стављен у службу осмишљавања нових терапија како за превенцију, тако и за третман дијабетеса и пратећих компликација, чинећи идеју иницијално оригиналном и научно врло актуелном. Комисија предлаже Научно-наставном већу Биолошког факултета да прихвати образложену тему и одобри **Невени Н. Савић** израду докторске дисертације под измењеним насловом „**Антифероптотски потенцијал природних и синтетских донора водоник-сулфида у анималном моделу дијабетеса**”. За менторе докторске дисертације предлажу се др Весна Оташевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ и др Ксенија Величковић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Београд, 22. 5. 2024.

Комисија:

др Весна Оташевић, научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Ксенија Величковић, доцент
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Ана Станчић, научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,
Институт од националног значаја за Републику Србију



Етичка комисија за заштиту
добробити огледних
животиња Института за
биолошка истраживања
„Синиша Станковић“,
Института од националног значаја
за Републику Србију,
Универзитета у Београду

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
"СИНИША СТАНКОВИЋ"

Број: 01-839

Датум: 11.04.2024 год.

БЕОГРАД, Бул. деспота Стефана бр.142

ПОТВРДА

Управа за ветерину, Министарства привреде шумарства и водопривреде Републике Србије донела је Решења о одобрењу спровођења огледа бр. 323-37-11487/2021-05, дана 18.11.2021. године и бр. 323-07-11136/2022-05, дана 10.10.2022. године, чиме су одобрени протоколи и употреба животиња у експерименталном делу докторске дисертације истраживача **Невене Савић** (Универзитет у Београду, Биолошки факултет, Број индекса: М3024/2021) под радним називом: **„Испитивање антифероптотског потенцијала природних и синтетских донора водоник сулфида у анималном моделу дијабетеса“**. Ова потврда издаје се за потребе пријаве теме докторске дисертације истраживача Невене Савић.

У Београду, 11.04.2024. године

Председник Етичке комисије

Тања Вуков, научни саветник ИБИСС





Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ

Управа за ветерину
Број: 323-07-11487/2021-05
Датум: 18.11.2021. године
Београд

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
„СИНИША СТАНКОВИЋ“
Београд

Примљено 25.11.2021.			
Орг. јед.	Број	Пажња	Вредн.
03	275		

Решавајући по захтеву Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, на основу члана 34. Закона о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС“ број 18/2016 и 95/18 - аутентично тумачење), члана 23. став 2. Закона о државној управи („Службени гласник РС“ број 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014, 47/18 и 30/18 и други закон) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије бр: 119-01-4/11/2020-09 од 28.10.2020. године, в.д. директор Емина Милакара, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом:

„ Испитивање ефекта примене феростатина и сулфорафана на развој дијабетеса типа 1 код мишева соја C57BL/6“

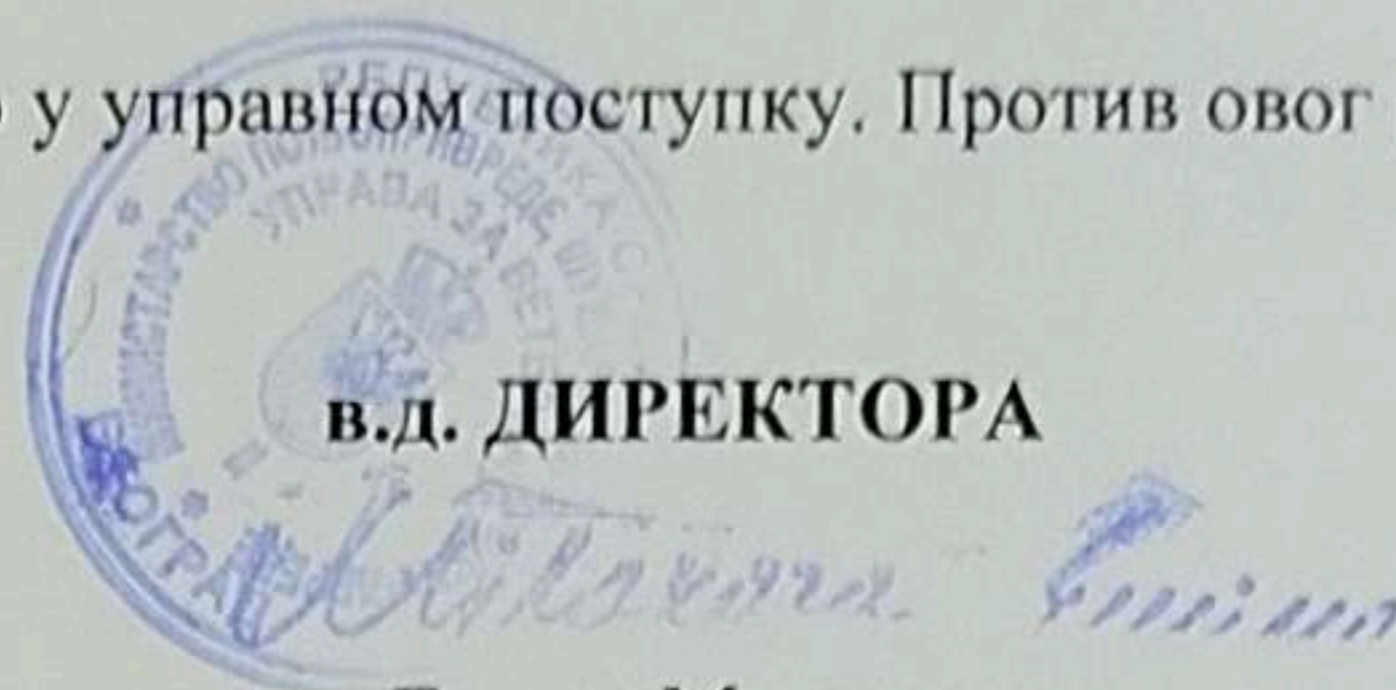
Образложење

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд обратио се овом министарству, дана 04.11.2021. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом: *„ Испитивање ефекта примене феростатина и сулфорафана на развој дијабетеса типа 1 код мишева соја C57BL/6“*

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња образцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10).

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложену документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку.

Поука о правном средству: Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор



в.д. ДИРЕКТОРА

Емина Милакара

Доставити:

1. Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Булевар Деспота Стефана 142, 11060 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1А/4, 11000 Београд
3. Евиденција
4. Архива



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-
Број: 323-07-11136/2022-05
Датум: 10.10.2022. године
Београд

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
„СИНИША СТАНКОВИЋ“
БЕОГРАД

Примљено:	14.10.2022.	
Орг. јед.	Број	Принтот
03	251	

Решавајући по захтеву Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд, за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, на основу члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку ("Службени гласник РС" број 18/2016 и 95/18 - аутентично тумачење), члана 23. став 2. Закона о државној управи ("Службени гласник РС" број 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014, 47/18 и 30/18 и други закон) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије бр. 119-01-4/11/2020-09, од 28.10.2020. године, в.д. директор Управе за ветерину, Емина Милакара, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд, и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом:

"Таргетовање фероптозе у дијабетесу и дијабетичним компликацијама водоник(пер)сулфидом".

Образложење

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд, обратио се овом министарству дана 06.10.2022. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом: "Таргетовање фероптозе у дијабетесу и дијабетичним компликацијама водоник(пер)сулфидом".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10). Саставни део документације чини и мишљење Етичке комисије.

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложену документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку.

Поука о правном средству: Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.

На основу члана 18., тачка 1. ЗОАТ-а, подносилац пријаве је ослобођен плаћања таксе.



в.д. ДИРЕКТОР

Emina Milakara
Емина Милакара

Доставити:

1. Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Булевар Деспота Стефана 142, 11060 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1А/4, 11000 Београд
3. Евиденција
4. Архива