

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12.07.2024. године, на основу молбе ментора, др Сање Ивковић, вишег научног сарадника Универзитета у Београду – Института за нуклеарне науке „Винча“, Института од националног значаја за Републику Србију и др Надежде Недељковић, редовног професора Универзитета у Београду – Биолошког факултета одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Ирене И. Јовановић Мацура**, истраживача сарадника Универзитета у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, под насловом: **„Утицај суплементације рибљим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести”** у саставу: др Јелена Ћирић, виши научни сарадник Универзитета у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, др Милош Митић, виши научни сарадник Универзитета у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију и др Сања Дацић, доцент Универзитета у Београду – Биолошки факултет.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Ирене И. Јовановић Мацура** под насловом **„Утицај суплементације рибљим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести”** урађена је на Одељењу за неуробиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду у склопу пројеката финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација написана је на српском језику на 79 страна подељених на следећа поглавља: **Увод** (16 страна), **Циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (9 страна), **Резултати** (22 стране), **Дискусија** (8 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (21 страна). Дисертација садржи **22 слике** (5 у поглављу Увод, 2 у поглављу Материјал и методе, и 15 у поглављу Резултати), **3 табеле** у поглављу Материјал и методе и 232 цитиране библиографске јединице. Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) елементе са неопходним информацијама о докторској дисертацији: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о ментору, члановима комисије за одбрану докторске дисертације и датумом

одбране, страну са информацијама о финансирању, изјаве захвалности, сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику (резиме, кључне речи, научна област и ужа научна област), листу скраћеница и садржај. На крају дисертације су наведени Биографија аутора и 3 прилога (Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу).

Анализа докторске дисертације

У уводу докторске дисертације, који је подељен на осам потпоглавља, на прегледан начин наведени су литературни подаци важни за разумевање проблематике докторске дисертације.

У првој целини описана је грађа ока са посебним освртом на мрежњачу и пигментни епител мрежњаче (МПЕ) који има метаболичку и транспортну улогу и омогућава нормално функционисање фоторецепторских ћелија (чепића и штапића), као и процеса виђења.

Састав и улогу липида у мрежњачи кандидаткиња је представила у другој целини увода. Поремећена хомеостаза липида у мрежњачи утиче на правилно одвијање процеса фототрансдукције, утиче на функционисање родопсина, на његову структуру и прелазак из неактивног у активно стање. Најзаступљенији липиди у мрежњачи су холестерол (један од главних структурних липида спољашњих сегмената мембрана фоторецептора) и полинезасићене масне киселине (ПНМК), првенствено докозахексаноинска киселина (ДХК). Нормална структура и функција мрежњаче зависи и од одржавања стабилног метаболизма холестерола у мрежњачи, односно одржавања равнотеже између локалне синтезе (72%-78%), уноса и елиминације холестерола из мрежњаче. За разлику од мозга где већина холестерола настаје *de novo* синтезом, холестерол у мрежњачи потиче добрим делом из крви (22%-28%). HMGCR (енгл. 3-hydroxi-3-metilglutaryl-CoA reduktaza) је главни ограничавајући ензим синтезе холестерола и експримира се у различитим слојевима мрежњаче. Кандидаткиња је укратко описала путеве уласка холестерола у ћелије мрежњаче помоћу стерол регулаторних елемент-везујућих протеина (енгл. sterol regulatory element-binding protein, SREBP) и елиминације холестерола из ових ћелија помоћу транспортне АТП-азе ABCA1 типа (енгл. atp-binding protein cassette 1), као и окистерола из породице цитохром P450, подпородица 27 i 46 (*Cyp27* је доминантан у мрежњачи а *Cyp46* у мозгу). Објашњено је да окистероли активирају јетрени рецептор X β (енгл. liver x receptor β , *Lxr β*) у путу биосинтезе холестерола, који онда утиче на *Abca1* и на аполипопротеине који су укључени у уклањање холестерола из ћелије, нпр. аполипопротеин E (*ApoE*). Такође, и експресија једне од *Sreb* изоформи *Srebpl-c*, која појачава активацију експресије гена укључених у синтезу масних киселина, под контролом је LXR β (главног регулатора уласка и изласка холестерола из ћелије). Масне киселине (МК) улазе у састав липида који изграђују фосфолипидни двослој мембране и неопходне су за развиће и функцију ћелијских мембрана мозга, мрежњаче, и других неуроналних ткива. ПНМК имају неуропротективни ефекат у патолошким процесима који доводе до пролиферативних и дегенеративних болести мрежњаче. Две најважније групе ПНМК су омега-3 и омега-6 МК. Незасићене МК, првенствено ДХК,

су присутније у мрежњачи него у било ком другом ткиву у организму. ДХК утиче на биофизичка својства мембране и учествује у регулацији активације родопсина током процеса фототрансдукције. Смањена количина ДХК смањује активност родопсина, док превелика количина доводи до спонтане активације родопсина и тиме до дегенерације фоторецептора. Заступљеност и количина липида у оку мења се током старења и у различитим патологијама.

У трећој целини дат је опис промена које се дешавају у оку у току физиолошког и патолошког старења. Кандидаткиња наводи да старосно-зависне промене представљају највећи фактор ризика за већину неуродегенеративних болести централног нервног система (ЦНС) и наглашава да мрежњача и МПЕ такође подлежу старосно-зависним променама на сличан начин као и мозак. Једно од најчешћих обољења ЦНС-а повезано са старењем је Алцхајмерова болест (АБ). Кандидаткиња посебно описује епидемиологију и демографију АБ. Познато је да се код пацијената оболелих од АБ не само у мозгу, већ и у оку, јавља поремећај у метаболизму амилоид бета прекурсорског протеина (енгл. „amyloid precursor protein“, АРР), као и да долази до унутарћелијског и ванћелијског накупљања амилоида бета (А β), високо токсичног агрегирајућег пептида кључног за настајање АБ патологије. Код анималних модела АБ примећено је и накупљање А β у крвним судовима мрежњаче што доводи до њене смањене прокрвљености и неуродегенерације. Посебно је описан 5XFAD мишији модел, један од често коришћених трансгених анималних модела АБ. Трансгени 5XFAD мишеви коекспримирају пет мутација које су карактеристичне за фамилијарну АБ. Услед велике сличности између мрежњаче и можданог ткива, на ћелијском и на биохемијском нивоу, све више истраживања је фокусирано на мрежњачу као јединствен модел за испитивање различитих патолошких стања везаних за мозак.

У четвртој целини описана је улога коју холестерол има у процесу старења, да холестерол код АБ регулише токсичност А β и утиче на пропустљивост крвно-мрежњачне баријере (КМрБ). На основу новијих литературних података показано је да мало смањење нивоа холестерола може имати протективни ефекат али да даље смањење може условити настанак АБ (нивои холестерола у мозгу код 5XFAD мишева за око 60% су нижи у односу на нетрансгене животиње) због чега је одржавање правилне хомеостазе холестерола изузетно важно.

У петој целини представљен је утицај састава липида и односа холестерола и ДХК у мембранама ендотелних ћелије капилара мозга и мрежњаче на регулацију трансцитозе и пропустљивости крвно-мождане (КМБ) и КМрБ са посебним освртом на промене у крвним судовима у оку и ЦНС током АБ. Кандидаткиња даље наводи да је избалансиране концентрације ДХК и холестерола у мрежњачи кључне за правилно функционисање МПЕ-а, и у шестој целини описује функције МПЕ-а у физиолошким условима са освртом на визуелни циклус ретинала. Једна од главних функција МПЕ-а је ензимска регенерација 11-цис ретинала кроз визуелни циклус који се састоји из серије ензимских реакција где се у сваком кораку конвертују интермедијери ретиноида. Кандидаткиња наводи ензиме визуелног циклуса, носаче ретиноидних протеина и њихов модулатор који раде секвенцијално у циљу регенерисања и константног снабдевања фоторецептора 11-цис ретиналом. Такође описује транскрипционе факторе и гене који су укључени у развиће МПЕ и/или у

функционисање визуелног циклуса. Повећана концентрација холестерола у мрежњачи повећава производњу 11-цис ретинала услед повећане експресије *Rpe65*, једног од најважнијих гена визуелног циклуса.

Студије су показале да је смањени ниво холестерола у плазми укључен у регулацију агрегације А β , хиперфосфорилацију тау протеина, као и регулацију апоптозе. Такође, у мозгу пацијената оболелих од АБ значајно је смањена количина ДХА, једне од најважнијих омега-3 масних киселина. Она преусмерава амилоидогени пут разградње АРР-а, који се одвија у патолошким условима АБ и чији је крајњи производ токсични А β , ка неамилоидогеном путу који се одвија у физиолошким условима.

Уводно поглавље је закључено прегледом доступне литературе о ефекту суплементације високим дозама рибљим уљем (РУ) на хомеостазу холестерола и пролонгирањем испољавањем симптома АБ.

Циљеви докторске дисертације су приказани јасно и концизно. Непосредни циљ ове докторске дисертације је да се испитају промене експресије гена који регулишу метаболизам холестерола у физиолошком и патолошком старењу, као и да се испита ефекат суплементације рибљим уљем, природног извора омега-3 МК, за које је показано да имају важну улогу у регулацији холестеролске хомеостазе. У складу са наведеним, постављени су и појединачни задаци истраживања:

1. Испитивање промена експресије гена који регулишу холестеролску хомеостазу у физиолошком старењу у мрежњачи и МПЕ-у.
2. Испитивање промена експресије гена који регулишу холестеролску хомеостазу у патолошком старењу (мишји модел АБ) у мрежњачи и МПЕ-у.
3. Испитивање ефекта суплементације рибљим уљем (РУ-ем) на експресију гена регулатора холестеролског метаболизма, у пресимптоматској фази АБ, као и на формирање и таложење А β у мрежњачи.
4. Испитивање промена експресије главних регулатора трансцитозе (MFSD2A) и глимфатичког система (AQP4) у мрежњачи током физиолошког старења.
5. Испитивање промена експресије главних регулатора трансцитозе (MFSD2A) и глимфатичког система (AQP4) у мрежњачи током патолошког старења (мишји модел АБ).
6. Испитивање ефекта суплементације РУ-ем на експресију главних регулатора трансцитозе и глимфатичког система, као и на формирање и таложење А β у мрежњачи у пресимптоматској фази АБ.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** наведени су протоколи, апаратура и хемикалије који су примењени у овој докторској дисертацији. У експериментима су коришћене само женке F1-генерације које су добијене укрштањем 5XFAD (коекспримирају пет мутација које карактеришу фамилијарни облик АБ) трансгених мужјака са B6SJLF1/J женкама, док су као контролне животиње коришћене нетрансгене женке из истих окота (енгл. wild-type, WT). Одређивање генотипа

животиња из сваког окота је рађено изолацијом ДНК из ткива репа, након чега је ДНК анализирана методом ланчане реакције полимеразе (PCR, енгл. *Polymerase Chain Reaction*). Животиње су одгајане у виваријуму Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић”. Детаљно су објашњене експерименталне групе и методе коришћене у реализацији циљева докторске дисертације. За испитивање физиолошког и патолошког старења 48 женки је распоређено у четири групе по 12 животиња: нетрансгени мишеви старости четири месеца (4М WT), трансгени мишеви старости четири месеца (4М 5XFAD), нетрансгени мишеви старости 12 месеци (12М WT) и трансгени мишеви старости 12 месеци (12М 5XFAD). За испитивања ефекта третмана рибљим уљем 28 женки старости 3 месеца подељене су у четири групе по 7 животиња: нетрансгени мишеви третирани водом (WT), трансгени мишеви третирани водом (5XFAD), нетрансгени мишеви третирани рибљим уљем (WT RU), трансгени мишеви третирани рибљим уљем (5XFAD RU). Животиње су оралном гаважом добијале по 100 μ l воде или комерцијалног РУ богатог омега-3 МК (DietPharm, FidaFarm Hrvatska) једном дневно током 21 узастопног дана. Експресија протеина синаптичке пластичности синаптофизина (SPH) и глијског фибрилрног киселог протеина (GFAP) маркера астроцита одређена је имуноблот техником (енгл. Western blot). Истом методом праћена је експресија протеина кључних за регулацију холестеролског метаболизма: HMGCR, ABCA1 и MFSD2A. Хистолошка боја Тиофлавин С коришћена је за детекцију плака. Имунофлуоресцентним бојењем испитиване су Милерове ћелије мрежњаче коришћењем антитела за њихов специфични протеински маркер Sox9. Праћена је експресија родопсина у фоторецепторским ћелијама, експресија амилоидних протеина (APP, A β) и протеина укључених у метаболизам холестерола (MFSD2A, AQP4) у мрежњачи и МПЕ, као и њихова васкуларна локализација (крвни судови су обележавани лектином). Изолацијом РНК и применом реверзне транскрипције, праћене PCR методом испитана је експресија гена кључних за регулацију метаболизма холестерола: *hmgcr*, *lrx β* , *abca1*, *apoE*, *mfsd2a*, *srebpl-c*, *aqp4*, *surp46*, *surp27*; гена који регулишу синаптичку пластичност: *sph* и гена који регулишу визуелни циклус ока: *sox9*, *rpe65*, *otx2*, *lhx2*, *dct*, *tyrP1*, *rlbp1*, *rbp1*, *best1*, *rgr*, *rdh5*. Описани су сви поступци у анализи резултата и начин на који су добијени резултати обрађени и презентовани. Након хистолошког и имунобојења микрографије су снимане на Axio Observer Microscope Z1, ZEISS микроскопу а квантификација снимљених сигнала рађена је у доступном програму Националног института за здравље (НИИ, САД) Image J, Version 1.74. За анализу података коришћен је *GraphPadPrism* програм (GraphPad Software, Inc., САД). Наведени су статистички тестови који су коришћени у тези: Man-Whitney U-test и двофакторска анализа варијансе (two-way ANOVA).

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је приказала резултате своје докторске дисертације на прегледан и концизан начин у оквиру две тематске целине. Прву целину чине резултати испитивања промена у мрежњачи током физиолошког и патолошког старења. Анализом SOX9 протеина, маркера Милерових ћелија, показано је да нема промена у броју и дистрибуцији ових глијских ћелија без обзира на узраст и генотип јединки. Експресија GFAP протеина мењала се само у патолошком старењу, па је у мрежњачи 12М 5XFAD женки значајно повећана у односу на остале испитиване

групе. Испитивање неуроналне дегенерације обележавањем фосфорилисане тешке субјединице неурофиламената указала је на дистрофију неурита само у мрежњачи 12М 5XFAD. Промене експресије родопсина у фоторецепторским ћелијама мрежњаче примећене су и у току физиолошког старења али је ефекат израженији у патолошком старењу. Промена у експресији SPH маркера синаптичке пластичности није било ни у једној од испитиваних група.

Иако 5XFAD мишеви прекомерно производе APP и имају плаке у мозгу резултати бојења Тиофлавином С показали су одсуство амилоидних плака у мрежњачи свих испитиваних група. Међутим, примећено је спорадично нагомилавање А β у крвним судовима 5XFAD мишева које се повећавало са старењем животиња што је указивало на повећану пропустљивост КМрБ. Промене липидног састава регулишу пропустљивост КМБ и КМрБ, па је анализирана експресије гена укључених у метаболизам холестерола. Показано је да се ниво експресије *Lxr β* (важног за интеграцију путева улаза и излаза холестерола) значајно смањује у физиолошком старењу. Ниво експресије *Lxr β* код 5XFAD животиња већ је у четвртном месецу био значајно смањен у односу на WT животиње, и остаје непромењен код 12 месеци старих животиња. Ниво експресије *Hmgcr* иРНК повећава се током физиолошког старења, а експресија овог гена код 5XFAD животиња у четвртном месецу значајно је нижа у односу на експресију код животиња дивљег соја и одржава се на том нивоу током старења. Експресија HMGCR протеина се не мења током физиолошког и патолошког старења али је ниво експресије статистички значајно мањи код 5XFAD животиња. Физиолошко и патолошко старење не утичу на експресију гена који регулишу транспорт холестерола у мрежњачи. Нивои експресије *Abca1* и *ApoE* иРНК не мењају се ни у једној испитиваној групи, што је установљено и на протеинском нивоу за ABCA1.

MFSD2A се у мрежњачи примарно експримира у ендотелним ћелијама и регулатор је транцитозе. На генском нивоу долази до смањене експресија *Mfsd2a* током физиолошког и патолошког старења. Смањена експресија примећена је и на протеинском нивоу током старења. Међутим ефекат генотипа је имао већи утицај, па је експресија овог протеина нарочито смањена код 4М 5XFAD животиња. Паралелно је рађена анализа *Srebp1-c* и уочен је пораст експресије код 4М 5XFAD мишева у односу на контролне 4М WT мишеве што уз значајно смањену експресију *Mfsd2a* у овој групи указује на могући механизам регулације експресије. AQP4 је праћен на генском и протеинском нивоу. Ниво *Aqp4* иРНК повећава се са старењем. Такође зависи од генотипа, па је повишен код обе групе 5XFAD животиња у односу на 4М WT. Western blot методом код дивљег соја показано је повећање експресије овог протеина са старењем, као и обе групе 5XFAD животиња у односу на 4М WT. Ови резултати су потврђени и имунофлуоресцентним бојењем AQP4 у мрежњачи. Праћењем периваскуларне локализације AQP4 уочено је да се смањује у свим праћеним групама у односу на 4М WT.

Један део резултата обухвата ефекте физиолошког и патолошког старења на експресију гена укључених у метаболизам холестерола и гена визуелног циклуса у МРЕ. Насупрот дешавањима у мрежњачи, у МРЕ експресија *Lxr β* расте током

физиолошког старења, док током патолошког старења (12М 5XFAD) нема промена, и експресија *Lxrβ* се не разликује од контролних 4М WT мишева. Анализа иРНК експресије *Hmgcr* у МРЕ је показала раст само у 12М WT у поређењу са 4М WT. На протеинском нивоу током старења се смањује експресија HMGCR. Нижи ниво протеинске експресије HMGCR измерен је код 5XFAD животиња у односу на 4М WT. Физиолошко и патолошко старење нису утицали на експресију гена који регулишу транспорт холестерола у мрежњачи. У МРЕ нису уочене статистички значајне промене на нивоу генске и протеинске експресије *Abca1* ни у једној испитиваној групи, али је повећана генска експресија *ApoE* у току физиолошког старења. Ниво овог гена није се мењао код 5XFAD животиња и био је сличан вредностима добијеним код 4М WT.

Експресија гена визуелног циклуса у МРЕ-у током старења мењала се само у случају *Rlbp1* код ког је уочен значајан пад експресије код 12М WT. Нису показане значајне промене у експресији осталих гена визуелног циклуса (*Sox9, Otx2, Lhx2, Rbp1, Rpe65, Best1, Rdh5, Rgr, Dct, Tyr i TyrP1*).

У другој целини поглавља резултати, анализирани су ефекти третмана РУ-ем на промене експресије гена укључених у метаболизам холестерола, на транцитозу и глимфатички систем у пресимтоматској фази АБ.

Анализа генске експресије *Lxrβ* и *Hmgcr* у мрежњачи показала је да третман РУ-ем доводи до смањене експресије испитиваних гена код дивљег соја док суплементација није имала значајан ефекат на низак ниво експресије ових гена у мрежњачи 5XFAD животиња. Мерење експресије гена који су укључени у регулацију транспорта холестерола показало је да је третман РУ-ем код дивљег соја смањио експресију *Abca1* гена у мрежњачи док је имао супротан ефекат код 5XFAD животиња. Није било ефекта РУ на експресију *ApoE* ни у једној испитиваној групи, као ни на експресију гена задужених за елиминацију холестерола из мрежњаче *Cyp27* и *Cyp46*.

У МРЕ тронедељни третман РУ повећава експресију *Hmgcr* и *Abca1* гена само код дивљег соја, а није имао ефекта на експресију *Lxrβ, ApoE, Cyp27* и *Cyp46* ни у једној испитиваној групи. Испитивање експресије ДХК транспортера у МРЕ-у под третманом РУ показало је значајан пораст експресије *AdipoR1* код 5XFAD у односу на дивљи сој. Третман повећава експресију *Mfsd2a* гена код дивљег соја, а нема ефекат на 5XFAD групу док се експресија *Srebp1-c*, регулатора MFSD2A експресије, не мења у МРЕ-у ни једне испитиване групе.

Последњу целину чине резултати који показују промену заступљености AQP4 у мрежњачи дивљег соја и 5XFAD мишева након третмана РУ, и смањену експресију Aβ у мрежњачи 5XFAD након тронедељног третмана РУ.

У оквиру **Дискусије** на јасан и садржајан начин анализирани су резултати докторске дисертације у контексту постојећих научних сазнања и указано је на значај добијених резултата за разумевање промена хомеостазе холестерола у оку током физиолошког старења и у 5XFAD моделу АБ. Ове промене могу да угрозе правилну функцију специфичних очних структура, мрежњаче и МРЕ, као и да стимулишу формирање и таложење токсичног Aβ. Дискутовани су ефекти суплементације риблијем уљем (природног извора омега-3 масних киселина) у пресимтоматској фази Алцхајмерове болести на регулацију холестеролске хомеостазе.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња је сумирала најважнија запажања која су произашла из анализе резултата њене докторске дисертације:

Експресија гена укључених у метаболизам холестерола се мења током физиолошког старења, док током патолошког старења остаје непромењена и у мрежњачи и у пигментном епителу мрежњаче (МПЕ). Нивои кључних гена одговорних за регулацију синтезе холестерола *Lxrβ* и *Hmgcr*, као и протеинска експресија НМГСР су значајно смањени у мрежњачи 5XFAD мишева у односу на дивљи сој (WT). Током старења долази до нагомилавања Аβ у крвним судовима мрежњаче 5XFAD животиња, али без присуства амилоидних плака.

Током физиолошког и патолошког старења смањује се генска и протеинска експресија *Mfsd2a*, главног регулатора трансцитозе у мрежњачи неопходног за преузимање ДХА. Нивои експресије су иницијално значајно нижи у мрежњачи 5XFAD женки у поређењу са WT.

Током физиолошког и патолошког старења у мрежњачи се повећава генска и протеинска експресија *Aqr4*, а истовремено је смањена периваскуларна експресија *Aqr4*.

Експресија гена који учествују у визуелном циклусу се не мења ни током физиолошког ни током патолошког старења, од свих испитиваних гена детектовано је само смањење експресије *Rlbp1* уМПЕ током старења.

Анализа експресије гена укључених у метаболизам холестерола показала је да тронедељни третман рибљим уљем (РУ) смањује експресију *Lxrβ* и *Hmgcr* гена у мрежњачи дивљег соја, док примењена суплементација не мења низак ниво експресије наведених гена у мрежњачи 5XFAD животиња. Третман РУ-ем смањује експресију *Abca1* гена у мрежњачи дивљег соја али има супротан ефекат код 5XFAD животиња. Није било ефекта РУ на експресију *ApoE* ни у једној испитиваној групи, као ни на експресију гена задужених за елиминацију холестерола из мрежњаче, *Cyp27* и *Cyp46*.

Експресија гена укључених у визуелни циклус се мења након третмана РУ у мрежњачи иМПЕ дивљег соја, али не и код 5XFAD. Анализа транскрипционих фактора укључених у регулацију визуелног циклуса је показала да је експресија гена *Sox9* и *Otx2* уМПЕ-у промењена након третмана РУ само код дивљег соја, док је код 5XFAD остала непромењена. Анализа експресије главнихМПЕ-специфичних компоненти визуелног циклуса показала је да третман РУ не утиче на експресију *Rpe65* иРНК а да смањује експресију *Rdh5* гена код дивљег соја. Анализа експресије гена носача ретиноидних протеина (*Rlbp*, *Rbp1*), модулятора процеса синтезе у визуелном циклусу (*Rgr*), гена регулатора експресије визуелног пигмента (*Tyr1*, *TyrP1* и *Dct*) као и *Best1* гена, показала је да третман РУ повећава генску експресију *Tyr* а смањује експресију *Rdh* код животиња дивљег соја, док на остале гене ни третман РУ-ем ни генотип нису имали утицаја.

Третман РУ повећава генску експресију *Mfsd2a* код дивљег соја а нема ефекат на 5XFAD групу, док се експресија *Srebp1-c*, регулатора MFSD2A експресије, не мења уМПЕ-у ни једне испитиване групе.

Тронедељни третман рибљим уљем враћа повишену иРНК и протеинску експресију *Aqr4*, главног регулатора глимфатичког система у оку, која је детектована

код 5XFAD животиња на контролни ниво, док периваскуларна експресија остаје непромењена.

Третман РУ-ем доводи до значајног смањења експресије А β у крвним судовима мрежњаче 5XFAD мишева.

У последњем поглављу **Литература** абecedним редом, на прегледан начин је наведено 232 библиографске јединице које су на адекватан начин цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

Из резултата ове дисертације су проистекла два рада у међународним научним часописима са SCI листе.

1. Jovanovic Macura I, Zivanovic A, Perovic M, Ciric J, Major T, Kanazir S, Ivkovic S. The Expression of Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein2a (Mfsd2a) and Aquaporin 4 Is Altered in the Retinas of a 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(18):14092.
M21 (IF₂₀₂₂ = 5,6) <https://doi.org/10.3390/ijms241814092>
2. Macura II, Djuricic I, Major T, Milanovic D, Brkic M, Sobajic S, Kanazir S, Ivkovic S. The high-dose fish oil supplementation increased Mfsd2a expression without altering DHA levels in the retina of healthy mice. *Journal of functional foods*. 2022;99:105302.
M21 (IF₂₀₂₂ = 5,6) <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105302>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја (M34)

1. Macura Jovanovic I, Djuricic I, Major T, Milanovic D, Brkic M, Sobajic S, Kanazir S, Ivkovic S. The high-dose fish oil (FO) supplementation increased Mfsd2a expression in the retina of healthy mice (2023) 8th CONGRESS OF SERBIAN NEUROSCIENCE SOCIETY with international participation, Belgrade, Serbia, p.66.
2. Macura Jovanovic I, Djuricic I, Brkic M, Milanovic D, Sobajic S, Kanazir S, Ivkovic S Fish-oil treatment in adulthood alters fatty acid composition and cholesterol-related gene expression affecting the visual cycle in mouse retina and RPE, 2019 FENS Regional Meeting Belgrade, Serbia, P269
3. Jovanovic Macura I, Milanovic D, Avramovic V, Loncarevic Vasiljkovic N, Mladenovic-Djordjevic A, Kanazir S, Ivkovic S. Aging of an eye – retinal impairments in physiological aging and Alzheimer’s disease. 2018, Nutrition Metabolism and Aging, Petnica, Srbija, p 23.
4. Jovanovic Macura I, Milanovic D, Loncarevic Vasiljkovic N, Mladenovic-Djordjevic A, Ivkovic S, Kanazir S. An old eye – retinal alterations in physiological aging and in 5xFAD mouse Alzheimer’s disease model. FENS Forum, 2018, Berlin, Germany. Poster C010.
5. Ivkovic S, Jovanovic Macura I, Avramovic V, Perovic M, Loncarevic Vasiljkovic N, Mladenovic-Djordjevic A, and Kanazir S. Alzheimer’s eye: retinal changes in 5xFAD AD mouse model. AAIC Satellite Symposium: “Aging and Alzheimer’s

Disease: Opportunities for Therapeutic Interventions.” Varna, Bulgaria 2017 (October 19-20). Poster 2B.

6. Jovanovic Macura I, Milanovic D, Avramovic V, Perovic M, Loncarevic Vasiljkovic N, Mladenovic-Djordjevic A, Ivkovic S, and Kanazir S. An old eye –retinal alterations in physiological aging and in 5xFAD mouse Alzheimer’s disease model. VII kongres drustva za neuronauke Srbije sa međunarodnim učešćem, 25-27. oktobar 2017, Beograd, Srbija. Poster C26, p.110.
7. Jovanovic Macura I, Ciric J, Milovanovic N, Major T, Perovic M, Ivkovic S. High dose fish oil supplementation decreases amyloid beta accumulation in retinal blood vessels in 5xFAD mice. Fens Forum 2024. Poster.
8. Jovanovic Macura I, Ciric J, Milovanovic N, Major T., Perovic M, Ivkovic S. Amyloid beta accumulation in retinal blood vessels in pathological aging is affected by high dose fish oil supplementation. Belgrade Neuroscience Next Hub 2024. 24-25. April 2024, Beograd, Srbija. Oralna prezentacija/poster

БЗ. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја (М64)

1. Jovanovic-Macura I, Milanovic D, Pavkovic Ž, Tesic V, Ivkovic S, Kanazir S. Cholesterol metabolism changes during aging in mouse retina, BILMS, Beograd, Srbija 2015

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (у даљем тексту: Правилник) и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Утицај суплементације риблим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести”, аутора Ирене И. Јовановић Мацура, ментор је констатовао да утврђено подударане текста износи **14%**. Овај степен подударности последица је приложених образаца, личних имена, афилијација, библиографских података о коришћеној литератури, цитата, стручних термина који се не могу другачије дефинисати (називи тестова, метода и протеина, састава инкубационих смеша и раствора, као и симбола коришћених у статистичком извештавању), тзв. општих места и података (укључујући етичке дозволе и услове гајења експерименталних животиња), као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из дисертације и за које постоји аутоцитат у тексту дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду.

Када се све изнето узме у обзир, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње **Ирене И. Јовановић Мацура**, под насловом „Утицај суплементације риблим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Након увида у докторску дисертацију **Ирене И. Јовановић Мацура**, као и у научне публикације проистекле из резултата ове докторске дисертације, Комисија закључује да приложена докторска дисертација представља оригинални научни допринос у изучавању хомеостазе холестерола у оку током физиолошког старења и у 5XFAD моделу Алцхајмерове болести и ефекта суплементације рибљим уљем (природног извора омега-3 масних киселина) у пресимптоматској фази Алцхајмерове болести, једног од најчешћих обољења централног нервног система.

Патолошке промене у оку оболелих су сличне онима у мозгу, али њихов тачан просторни и временски распоред појава у раним фазама болести и промене током напредовања болести нису до краја разјашњене. Због велике сличности између мрежњаче и можданог ткива на ћелијском и на биохемијском нивоу, боље познавање промена у мрежњачи везаних за старење има изузетно важан дијагностички потенцијал. Добијени резултати показују да третман високим дозама рибљим уљем може имати протективни ефекат на одржавање крвно-мрежњачне баријере и указује на потенцијал рибљег уља у адјувантним и профилактичким терапијама у циљу јачања крвних судова.

Имајући у виду значај и могући утицај ове истраживачке проблематике на боље разумевање патологије Алцхајмерове болести чему сведоче и два публикована оригинална научна рада са СЦИ листе и девет саопштења са домаћих и међународних скупова, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду да овај извештај прихвати и одобри **Ирени И. Јовановић Мацура** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Утицај суплементације рибљим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести ”

КОМИСИЈА:

У Београду, 27.09.2024. године

др Јелена Ћирић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Милош Митић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Сања Дацић, доцент,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет