

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На седници **Наставно-научног већа** Медицинског факултета у Београду, одржаној дана 18.12.2024. године, број 19/II-3/3-ДВ, именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

**„Утицај скраћеног дневног излагања светлости на бихејвиоралне, биохемијске и молекуларне промене у мозгу и ретини на експерименталном моделу дијабетес мелитуса“**

кандидата др Долике Васовић, запослене на Клиници за очне болести Универзитетског Клиничког центра Србије.

Име и презиме ментора	Звање	Научна област	Установа у којој је запослен
др Душан Младеновић	Ванредни професор	Патолошка физиологија	МФУБ
др Оливера Станојловић	Редовни професор	Медицинска физиологија	МФУБ

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

Име и презиме члана комисије	Звање	Научна област	Установа у којој је запослен
др Драган Хрнчић	Ванредни професор	Медицинска физиологија	МФУБ
др Дејан Рашић	Доцент	Офталмологија	МФУБ
др Милена Весковић	Доцент	Патолошка физиологија	МФУБ
др Јелена Милашин	Редовни професор	Генетика	Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
др Мирослав Вукосављевић	Редовни професор	Офталмологија	ВМА

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршене докторске дисертације једногласно подноси Научном већу Медицинског факултета следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**А) Приказ садржаја докторске дисертације**

Докторска дисертација др Долике Васовић написана је на укупно 89 страна и подељена је на следећа поглавља: увод, циљеви истраживања, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци и литература. Дисертација садржи 3 табеле, 15 графикана и 17 слика. Докторска дисертација садржи још: садржај, сажетак на српском и енглеском језику, податке о комисији, писмо захвалности, биографију докторанда, списак

публикованих резултата који су произашли из тезе, као и пратеће изјаве: Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

У **Уводу** је детаљно размотрен дијабетес мелитус као један од најзначајнијих глобалних здравствених изазова, са нагласком на патогенезу његових компликација, укључујући промене на ретини у склопу дијабетичке ретинопатије и психолошке поремећаје у смислу повећане анксиозности. Посебна пажња посвећена је улози оксидативног стреса и инфламаторних процеса у нарушавању функције мозга и ретине. Детаљно је анализирана веза између хипергликемије, оксидативног стреса и глиозе, као и њихов утицај на визуелни процес и развој дијабетичке ретинопатије. Истакнут је значај циркадијалних ритмова и мелатонина у регулацији неурофизиолошких и биохемијских процеса, са посебним освртом на улогу циклуса светлост-тама у синхронизацији биолошких часовника у ћелијама под утицајем супрахиазматског једра у хипоталамусу. Такође је указано је на улогу поремећаја циркадијалног ритма у патогенези дијабетеса и његових компликација као и на потенцијални значај одржавања физиолошког циркадијалног ритма у успорењу развоја дијабетичких компликација, укључујући неуропсихијатријске и офталмолошке компликације.

**Циљеви истраживања** ове докторске дисертације били су усмерени на испитивање утицаја скраћеног дневног излагања светлости на понашање слично анксиозности, експлоративно понашање и промене у ретини изазване дијабетесом код пацова третираних стрептозотоцином. Истражен је утицај скраћеног излагања светлости на пропустљивост крвно-ретиналне баријере, као и на експресију аквапорина 4 (Aqp4) и глијалног фибриларног киселог протеина (енгл. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) у ретини. Детаљно је анализирано дејство скраћене светлосне експозиције на експресију гена повезаних са визуелним циклусом, запаљењем, као и гена укључених у метаболизам холестерола у ретини. Поред тога, циљ докторске дисертације био је и да се испита утицај скраћеног излагања светлости на оксидативни стрес у мозгу, као и на липидни статус и профил масних киселина у триацилглицеролима серума пацова са дијабетес мелитусом индукованим стрептозотоцином.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно су изложени експериментални дизајн и примењене савремене методе. У истраживању су коришћени одрасли мужјаци пацова соја *Wistar*, старости 8 недеља и телесне масе од 170 до 200 g. Животиње су узгајане у акредитованом виваријуму Војномедицинске академије у Београду, а чуване у поликарбонатним кавезима под стандардним лабораторијским условима (температура  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажност ваздуха 50%, циклус светлост/тама 12/12 h). Током експеримента, пацовима су вода и храна били доступни *ad libitum*.

Експеримент је обухватио 39 пацова, који су били насумично распоређени у четири групе: 1. контролна група третирана физиолошким раствором и изложена циклусу светлост/тама 12/12 h; 2. група са дијабетесом изложена циклусу светлост/тама 12/12 h; 3. група третирана физиолошким раствором на циклусу светлост/тама 6/18h; 4. група са дијабетесом изложена циклусу светлост/тама 6/18h.

Дијабетес је индукован једнократном интраперитонеалном инјекцијом стрептозотоцина (100 mg/kg), док су контролне групе третиране 0,9% раствором NaCl. Пацови су били изложени одговарајућем циклусу светлост/тама три недеље, уз мониторинг гликемије. Пацови са гликемијом  $>16,5 \text{ mmol/L}$  укључени су у даље истраживање.

Испитивање понашања обухватало је тест уздигнутог крстастог лавиринта и тест отвореног поља, са циљем процене анксиозности, локомоторне активности и експлоративног понашања. Биохемијски параметри оксидативног стреса анализирани су из узорака хипокампуса, таламуса и кортекса, а испитивани су укупни садржај протеинских тиолних група, ниво малондиалдехида (MDA), као и активности супероксид дизмутазе (SOD) и глутатион пероксидазе (GPx). У узорцима ретине и ретиналног пигментног епитела (РПЕ) анализирана је експресија гена за проинфламаторне цитокине (*IL-1*, *TNF- $\alpha$* ), визуелни циклус (*RPE65*, *LRAT*, *SOX9*, *OTX2*) и метаболизам холестерола (*HMGCR*, *APOE*, *CYP27*). Профил масних киселина у триацилглицеролима серума одређен је методом гасне хроматографије.

Имунохистохемијска анализа укључивала је процену ангионеогенезе у ретини бојењем крвних судова лектином, анализу експресије Aqp4 и процену активације глијалних ћелија на основу бојења на GFAP. Узорци су анализирани флуоресцентном микроскопијом, а резултати су квантитативно обрађени софтвером *ImageJ*.

Сви експериментални поступци изведени су у складу са директивом Европског парламента (2010/63/EU) и одобрени од стране Етичког комитета Универзитета у Београду (бр. 9101/1). Статистичка анализа спроведена је у програму SPSS 22.0, а статистички значајна разлика утврђена је при  $p < 0,05$ .

У поглављу **резултати** детаљно су описани и јасно представљени сви добијени резултати.

**Дискусија** је написана јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата докторске дисертације.

**Закључци** сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада. Коришћена **литература** садржи списак од 157 референци.

## **Б) Провера оригиналности докторске дисертације**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „УТИЦАЈ СКРАЋЕНОГ ДНЕВНОГ ИЗЛАГАЊА СВЕТЛОСТИ НА БИХЕЈВИОРАЛНЕ, БИОХЕМИЈСКЕ И МОЛЕКУЛАРНЕ ПРОМЕНЕ У МОЗГУ И РЕТИНИ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСА“, аутора Долике Васовић, констатовано је да подударност текста износи **16%**. Овај степен подударности последица је претежно назива коришћених супстанци и опреме, претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, опште прихваћених фраза, као и описа стандардних процедура извођења експеримената, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај указује на оригиналност докторске дисертације.

## **Ц) Кратак опис постигнутих резултата**

Бихејвиорална анализа је показала да су пацови са дијабетесом, изложени скраћеном фотопериоду, испољили смањен анксиозни образац понашања. У тесту отвореног поља ове животиње су проводиле више времена у централној зони, уз већу истраживачку активност и прелазак веће укупне дистанце у поређењу са контролном групом. Слично

томе, у тесту уздигнутог крстастог лавиринта, пацови изложени редукованој количини светлости су проводили више времена и чешће улазили у отворене краке лавиринта у односу на пацове са дијабетесом који су били изложени стандардном циклусу светлост тама. Ови резултати указују на важну улогу светлосне експозиције у регулацији емоционалних реакција у дијабетесу.

Скраћена светлосна експозиција је такође довела до значајног смањења оксидативног стреса у мозгу пацова. Концентрација MDA, маркера липидне пероксидације, била је значајно снижена, док је активност антиоксидативног ензима SOD била повећана у групи дијабетичних пацова изложених циклусу светлост тама 6/18 h у односу на групу дијабетичних пацова на стандардном циклусу светлост тама (12/12h). Ови биохемијски параметри сугеришу да скраћена светлосна експозиција доприноси смањењу анксиозности у дијабетесу посредством смањења оксидативног стреса у мозгу.

На нивоу ретине, скраћено излагање светлости је довело до ублажавања васкуларних промена у дијабетесу што се огледа у смањеном броју видљивих крвних судова бојених лектином. Такође, скраћено излагање светлости довело је до значајних промена у експресији гена повезаних са визуелним циклусом. Повећана експресија гена *RPE65* и *LRAT* у РПЕ указује на убрзање регенерације 11-*cis* ретинола у визуелном циклусу. Овај механизам може имати заштитну улогу у условима хипергликемије, доприносећи очувању функције ретине. Поред тога, уочено је значајно смањење експресије инфламаторних цитокина *TNF- $\alpha$*  и *IL-1 $\beta$* , што указује на снажно антиинфламаторно дејство скраћене светлосне експозиције у ретини дијабетичких пацова. Скраћено излагање светлости довело је до значајног убрзања промета холестерола у ретини дијабетичких пацова преко повећања експресије *HMGCR*, *APOE* и *CYP27* гена у РПЕ. Редистрибуција *Aqr4* у ретини представља још један значајан налаз у овој докторској дисертацији. Утврђено је да скраћено излагање светлости смањује укупну експресију *Aqr4*, али истовремено повећава његову периваскуларну експресију. Ова адаптивна промена смањује ризик од цитотоксичног едема ретине и помаже у очувању интегритета крвно-ретиалне баријере.

Липидни профил дијабетичких пацова изложених смањеној количини светлости показао је значајно смањење нивоа триацилглицерола у серуму и значајно повећање концентрације HDL холестерола сугеришући могући заштитни ефекат у развоју кардиоваскуларних компликација дијабетеса. Ове промене су биле удружене са повећаним нивоом докозахексаеноинске, олеинске и дихомо- $\gamma$ -линоленске киселине у триацилглицеролима серума.

Наведени резултати указују да скраћено излагање светлости ублажава промене у ретини у дијабетесу антиинфламаторним дејством, убрзањем промета холестерола и убрзањем регенерације 11-*cis* ретинола, као и да испољава анксиолитичко дејство смањењем оксидативног стреса у мозгу пацова. Смањена светлосна експозиција у току ноћних сати може представљати додатну меру успоравања развоја ретинопатије и анксиозности у дијабетесу.

#### **Д) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе**

На основу добијених података и упоредне анализе са релевантном литературом, уочене су важне сличности и специфичности које доприносе бољем разумевању утицаја скраћене светлосне експозиције на развој дијабетичких компликација. Ова докторска дисертација и радови који су из ње произашли су први показали да скраћено излагање светлости као природни стимулус за синтезу мелатонина успорава развој васкуларних

промена и инфламације у ретини као и развој анксиозности у дијабетесу. Улога инфламације у развоју дијабетичке ретинопатије је добро позната (Jiang и сар., 2016; Tu и сар., 2020). Смањење експресије гена за проинфламаторне цитокине представља један од механизма протективног дејства скраћеног излагања светлости у дијабетичкој ретинопатији. Ово је у складу са претходним истраживањима која су показала антиинфламаторну улогу мелатонина у дијабетичкој ретинопатији (Oliveira-Abreu и сар., 2021).

Претходна истраживања су потврдила да је Aqr4, као главни аквапорин у ретини, кључан за одржавање осмотске хомеостазе и интегритета крвно-ретиналне баријере (Verkman и сар., 2006; Nagelhus и Ottersen, 2013). Поремећаји у експресији Aqr4 изазвани хипергликемијом, који често доводе до цитотоксичног едема и прогресивног оштећења ретине (Cui и сар., 2012; Nicchia и сар., 2016) су ублажени смањеним излагањем животиња светлости. Резултати докторске дисертације су показали смањење укупне експресије Aqr4 и његову редистрибуцију у периваскуларне регионе удружено са смањењем ангионеогенезе које се огледа кроз смањен број лектин-позитивних крвних судова. Редистрибуција Aqr4 представља адаптивни одговор на инфламацију и оксидативни стрес, што је у претходним истраживањима идентификовано као механизам очувања интегритета дубоког капиларног плексуса и смањења ризика од развоја вазогеног едема (Oosuka и сар., 2020).

Осим утицаја на инфламацију и експресију Aqr4, докторска дисертација је показала да скраћено излагање светлости убрзава визуелни циклус у дијабетесу преко повећања експресије *LRAT* и *RPE65*, ензима који врше естерификацију и изомеризацију *all-trans* ретинола. Слични резултати су уочени у претходним истраживањима која су истицала улогу RPE65 у одржавању визуелне функције и превенцији оксидативног оштећења ретине (Strauss, 2005; Sparrow и сар., 2010). Експресија ових ензима регулисана је транскрипционим факторима *SOX9* и *OTX2* чија је експресија такође повећана у условима редуковане светлосне експозиције. Ова докторска дисертација прва указује на убрзање визуелног циклуса као потенцијалног механизма протективне улоге смањене експозиције светлости у дијабетесу, а у складу са претходним истраживањима која су расветлила молекулске механизме визуелног циклуса и његов утицај на фототрансдукцију (Strauss, 2005; Sparrow и сар., 2010).

Још један потенцијални механизам протективног дејства смањеног излагања светлости у дијабетичкој ретинопатији проучаван у овој дисертацији је утицај на метаболизам холестерола у ретини. Познато је да ретина за разлику од мозга може преузимати холестерол из плазматског LDL, али и да може синтетисати холестерол у РПЕ који заједно преузимају и користе фоторецептори (Zhang и сар., 2021; Zhu и сар., 2020). У дијабетичкој ретинопатији инфлукс холестерола у ретину је нерегулисан због нарушавања крвно-ретиналне баријере, док су ефлукс и оксидација холестерола у оксистероле смањени што доприноси поремећајима визуелног процеса (Busik, 2021). Ова докторска дисертација је потврдила ове резултате и прва показала да скраћено излагање светлости убрзава синтезу, интратиналну размену и оксидацију холестерола. У складу са познатом улогом метаболизма холестерола у визуелном процесу (Busik, 2021) ова дисертација је правилно нагласила да би убрзан промет холестерола у ретини могао бити додатни механизам протективног дејства редуковане светлосне експозиције у дијабетичком оштећењу ретине.

Синергистички ефекат антиинфламаторних механизма и убрзања метаболизма холестерола и визуелног циклуса може играти важну улогу у очувању ретиналне

функције и успорењу прогресије дијабетичне ретинопатије. Ови налази указују на потенцијал скраћеног излагања светлости као стратегије за успорење развоја дијабетичке ретинопатије.

Резултати ове докторске дисертације показују да скраћена светлосна експозиција доводи до значајног смањења анксиозности код пацова са дијабетесом. Ови налази су у складу са претходним клиничким студијама које су указале да примена егзогеног мелатонина може редуковати преоперативну анксиозност (Madsen и сар., 2020). Један од механизма анксиолитичког дејства скраћеног излагања светлости укључује редукацију оксидативног стреса са смањењем липидне пероксидације, а која је изазвана повећањем активности антиоксидативних ензима. Улога оксидативног стреса у настанку анксиозности је добро позната (Souza и сар., 2007; Desrumaux и сар., 2005; Berry и сар., 2007; Dang и сар., 2022) и показано је да ниво MDA у хипокампусу и префронталном кортексу корелише са анксиозношћу (Dang и сар., 2022). Такође, претходна истраживања истичу и значај антиоксидативне заштите у превенцији оштећења мозга изазваних хипергликемијом (Butterfield и сар., 2006; Chen и сар., 2013). Познато је да мелатонин испољава антиоксидативно дејство у мозгу повећањем експресије Nrf2, транскрипционог фактора који индукује гене за антиоксидативне ензиме (He и сар., 2018; Zhu и сар., 2021). Ова докторска дисертација је прва на експерименталном моделу показала да скраћено излагање светлости као природни стимулус за синтезу мелатонина смањује анксиозност и ублажава оксидативни стрес у мозгу у дијабетесу.

Смањена светлосна експозиција такође је довела до значајног смањења нивоа триацилглицерола у серуму и повећања концентрације HDL холестерола. Такође профил масних киселина у триацилглицеролима серума је био измењен са повећањем нивоа докозахексаеноинске, олеинске и дихомо- $\gamma$ -линоленске киселине. Ови резултати су компатибилни са претходним студијама које су истраживале метаболичке ефекте различитих терапијских интервенција код дијабетичких животиња (Hammer и сар., 2017; Busik, 2021). Побољшање липидног профила указује на могућност доприноса скраћеног излагања светлости смањењу ризика од кардиоваскуларних компликација дијабетеса.

У закључку, резултати ове дисертације пружају значајну подршку претходним налазима, али истовремено уносе нове увиде у комплексну улогу скраћене светлосне експозиције у регулацији неурофизиолошких и биохемијских процеса код дијабетеса. Добијени налази сугеришу да скраћено излагање светлости може представљати важну компоненту у развоју нових терапијских и превентивних приступа за ублажавање дијабетичних компликација, посебно у домену ретинопатије и неуропсихијатријских пормећаја. Ова дисертација отвара могућност за даља испитивања механизма протективног дејства редукације светлосне експозиције у дијабетесу.

## **Е) Објављени радови који чине део докторске дисертације**

1. **Vasović D**, Ivković S, Živković A, Major T, Milašin J, Nikolić N, Simonović J, Šutulović N, Hrnčić D, Stanojlović O, Vesković M, Rašić D, Mladenović D. Reduced light exposure mitigates streptozotocin-induced vascular changes and gliosis in diabetic retina by an anti-inflammatory effect and increased retinal cholesterol turnover. *Chem Biol Interact.* 2024;394:110996. doi: 10.1016/j.cbi.2024.110996 (**M21, IF 4,700**)

2. **Vasović D**, Vesković M, Šutulović N, Hrnčić D, Takić M, Jerotić Đ, Matić M, Stanojlović O, Ivković S, Jovanović Macura I, Mladenović D. Shortened daily photoperiod alleviates

anxiety-like behaviour by antioxidant effect and changes serum free fatty acid profile in diabetic rats. *J Pers Med.* 2023;13(5):744. doi: 10.3390/jpm13050744 (M22, IF 3,000)

### **Прегледни рад у часопису Медицински подмладак:**

1. **Vasović D**, Mladenović D, Stanojlović O. Patogenetski mehanizmi retinopatije i neurodegeneracije u dijabetes melitusu - protektivno dejstvo melatonina. *Medicinski podmladak* 2026; 77(6) DOI 10.5937/mp77-52396.

### **Ф) Закључак (образложење научног доприноса)**

Докторска дисертација „Утицај скраћеног дневног излагања светлости на бихејвиоралне, биохемијске и молекуларне промене у мозгу и ретини на експерименталном моделу дијабетес мелитуса“ др Долике Васовић представља значајан научни допринос у истраживању потенцијалних мера хигијенско-дијететског режима које успоравају развој дијабетичких компликација, пре свега дијабетичке ретинопатије и неуропсихијатријских поремећаја. Дисертација пружа увид у сложене патофизиолошке механизме којим скраћено излагање светлости остварује протективно дејство у ретинопатији и анксиозности са нагласком на интегративну улогу антиоксидативних, антиинфламаторних механизма и измена у метаболизму холестерола и у визуелном циклусу. Такође ова дисертација посредно доприноси бољем разумевању улоге поремећаја циркадијалног ритма у настанку дијабетичких компликација. Рад је оригиналан јер по први пут на систематичан начин описује утицај скраћене светлосне експозиције на експресију и дистрибуцију Aqr4 у ретини дијабетичких животиња, на експресију проинфламаторних цитокина и кључних гена у метаболизму холестерола и у визуелном циклусу. Осим тога, истраживање је указало на значај поштовања циркадијалног ритма у смањењу васкуларних компликација дијабетеса, што отвара могућност за развој нових превентивних и терапијских стратегија. Показано је да скраћена светлосна стимулација доводи до значајног смањења оксидативног стреса и побољшања антиоксидативног капацитета у мозгу пацова, што је резултирало ублажавањем анксиозности код дијабетичких животиња. Ови налази су у складу са савременим трендовима мултидисциплинарног приступа у истраживањима који интегрише неурофизиологију, ендокринологију и молекуларну биологију у циљу бољег разумевања сложених патофизиолошких процеса код дијабетичких компликација.

Поред значаја за научну заједницу, резултати дисертације кроз даљу транслациону анализу могу имати и ширу клиничку примену. Потенцијално развијање хигијенско-дијететских мера које би укључивале редукцију светлосне експозиције или примену мелатонина могло би значајно допринети успоравању развоја компликација дијабетеса, посебно оних који захватају централни нервни систем и ретину. Дисертација доноси важан допринос у разумевању веза између животних навика, као што је дневна изложеност светлости, и метаболичких обољења, те може послужити као основа за будућа клиничка истраживања у овој области.

Ова докторска дисертација је урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви су били прецизно дефинисани, научни приступ је био оригиналан и пажљиво изабран, а методологија рада је била савремена. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног, и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију др Долике Васовић и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду,

28.01.2025.

Чланови Комисије:

Проф. др Драган Хрнчић

---

Доц. др Дејан Рашић

---

Доц. др Милена Весковић

---

Проф. др Јелена Милашин

---

Проф. др Мирослав Вукосављевић

---

Ментори:

Проф. др Душан Младеновић

---

Проф. др Оливера Станојловић

---