

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На **X** редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној **11. 9. 2015.** године, прихваћен је извештај ментора др Маје Чакић-Милошевић, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **мр Njia Milad Ali Rajab**, под насловом „**Хистолошке и ултраструктурне промене интерскапуларног мрког масног ткива пацова у експериментално индукованом системском хипертироидизму**“ („**Histological and ultrastructural alterations of rat interscapular brown adipose tissue in experimentally induced systemic hyperthyroidism**“) и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: **др Маја Чакић-Милошевић**, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Радмила Глишић**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и **др Мирела Укропина**, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Пошто је прегледала урађену докторску дисертацију, Комисија Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **мр Njia Milad Ali Rajab** под насловом „**Хистолошке и ултраструктурне промене интерскапуларног мрког масног ткива пацова у експериментално индукованом системском хипертироидизму**“ („**Histological and ultrastructural alterations of rat interscapular brown adipose tissue in experimentally induced systemic hyperthyroidism**“) написана је на 117 страна и садржи 51 слику и 7 табела. Текст садржи 7 уобичајених поглавља: **Увод** (23 стране), **Циљеви рада** (2 стране), **Материјал и методи** (7 страна), **Резултати** (48 стране), **Дискусија** (21 стране), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (14 страна).

#### Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** докторске дисертације, у његовом првом делу, **мр Njia Milad Ali Rajab** укратко подсећа на историјат изучавања биологије мрког масног ткива (ММТ). Од првог познатог описа, преко решавања бројних непознаница везаних за функцију, кандидаткиња нас доводи до савремених сазнања о улози ММТ у регулацији не само температурне хомеостазе већ и целокупног енергетског метаболизма хомеотермних сисара. Посебно место у овом кратком прегледу заузимају најновија открића о присуству ММТ код одраслих људи и могућностима његовог укључивања у лечење метаболичких поремећаја.

У наставку уводног дела дисертације, **мр Njia Milad Ali Rajab** нас упућује у основне анатомске карактеристике ММТ, ослањајући се при томе на савремени концепт

адипозног органа према којем се целокупно масно ткиво присутно у телу сисара разматра као дифузни орган у чијим појединим регионима преовлађују специфични типови адипоцита. Приложен је и тренутно актуелни шематски приказ диференцијације мезенхимске матичне ћелије ка белим, беж или мрким адипоцитима, уз истицање могуће интерконверзије ових типова адипоцита.

Кандидаткиња затим излаже основне податке о хистолошкој организацији ММТ и типовима адипоцитних и неадипоцитних ћелија које се у њему могу срести, спуштајући се постепено до ултраструктурног нивоа. Описујући фину структуру мрких адипоцита, обухвата све њихове особености, а посебну пажњу обраћа на митохондрије и липидна тела као субћелијске структуре од кључне важности за термогену функцију мрког адипоцита.

Пратећи логичан ток излагања, на ово се надовезују информације о механизмима одвијања термогенезе у ММТ, физиолошкој регулацији термогеног процеса норадреналином и његовим модификацијама под утицајем других хормона. Укратко су изложени и данас веома актуелни подаци о томе да је масно ткиво уопште, а тиме и ММТ извор бројних биолошки активних молекула који испољавају аутокрине, паракрине или ендокрине ефекте.

Затим следе основни подаци о типовима термогенезе у организму хомеотермних сисара, чиме се успоставља веза између ММТ као ефектора адаптивне термогенезе и тироидне жлезде/тироидних хормона као регулатора облигаторне термогенезе, приказаних у другом делу увода.

Уводни део ове дисертације затвара се разматрањем литературних података везаних за утицај тироидног дисбаланса на морфолошке и функционалне карактеристике ММТ, са посебним освртом на још увек недовољно разјашњене ефекте системског хипертироидизма.

Постављајући **Циљеве** ове дисертације, кандидаткиња се најпре осврће на гојазност и поремећаје метаболизма као на данас све чешће медицинске проблеме чијем решавању или бар ублажавању потенцијално могу допринети фармаколошке интервенције на нивоу ММТ. Имајући у виду опште познате ефекте системског хипертироидизма на модулацију енергетске ефикасности, као и неопходност присуства довољне количине тироидних хормона за нормално одвијање термогенезе у ММТ, поставља се питање да ли системски хипертироидизам може, и ако може на који начин и под којим условима, побудити термогену активност ММТ. Стога је основни циљ ове дисертације био утврђивање дејства системског хипертироидизма индукованог тријод-тиронином (Т3) или тироксином (Т4) на структурно ремоделирање и термогени капацитет ММТ, уз посебно праћење евентуално постојећих разлика у деловању ова два хормона. У сврху прибављања резултата, коришћени су хистолошки, ултраструктурни, стереолошки, хистохемијски, имунохистохемијски и биохемијски методи.

С обзиром на то да се тироидни хормони данас користе као додатна терапијска средства у лечењу неких обољења, додатни циљ ове дисертације био је испитивање могућих токсичних ефеката системског хипертироидизма на штитну жлезду.

У оквиру поглавља **Материјал и методи** описани су дизајн експеримента и методи коришћени у реализацији постављених циљева. Као експериментални *in vivo* модел коришћени су мужјаци пацова Wistar соја, тежине 180-250 g, држани на собној температури, под стандардним лабораторијским условима. Животиње су биле подељене у три једнаке групе и третирани на следећи начин: Т3-третман - 200 µg/kg телесне масе Т3 раствореног у 9 mM NaOH; Т4-третман - 300 µg/kg телесне масе Т4 раствореног у 9 mM NaOH; еутироидна контрола - 9 mM NaOH, 1 ml/kg телесне масе, *i.p.* На крају

експеримента који је трајао пет дана, животиње су жртвоване, узети су узорци крви за одређивање нивоа тироидних хормона (RIA метод), изоловано је интерскапуларно ММТ и на уобичајен начин спроведено за светлосну и електронску микроскопију. На исти начин изолована је и обрађена тироидна жлезда.

Рутинска морфолошка анализа ММТ на нивоу светлосне микроскопије спроведена је на парафинским пресецима обојеним хематоксилином и еозином, као и на полутанким, пресецима материјала укалупљеног у смолу, обојеним толуидин-плавим. Пресеци обојени хематоксилином и еозином употребљени су и за стереолошку анализу на нивоу светлосне микроскопије. За процену прокрвљености и инервисаности ММТ анализирани су парафински пресеци обојени методима по Новелију, односно по Бодијану, пресеци обојени PAS реакцијом служили су за утврђивање присуства гликогенских депоа, а апоптоза је детектована применом бојења пропидијум-јодидом. На нивоу светлосне микроскопије извршена је и имунохистохемијска детекција UCP1, Ki67 и TNF $\alpha$ . Ултратанки пресеци материјала спроведеног за електронску микроскопију служили су за испитивање ултраструктурних и стереолошких карактеристика мрких адипоцита. Већина поменутих метода примењена је и за анализу тироидне жлезде.

У следећем поглављу, **Резултати** истраживања изложени су у оквиру две засебне целине. Прва целина обухватила је резултате добијене испитивањем утицаја високих доза два главна тироидна хормона на штитну жлезду. Показано је да су примењени третмани довели до успостављања системског хипертироидизма и, у исто време, до супресије синтетске активности тироидне жлезде. Анализа тироидне жлезде на нивоу светлосне и електронске микроскопије, подржана резултатима добијеним применом стереолошких метода, показала је да је у обе третиране групе дошло до инволутивних промена, које су биле нешто наглашеније после Т4-третмана.

Други, квантитативно значајнији део поглавља Резултати, почиње излагањем података добијених испитивањем системског деловања примењених третмана, који су показали да су оба третмана довела до смањеног прираста телесне масе, док је Т4-третман изазвао и статистички значајно повећање телесне температуре. Показано је такође да је на супрафизиолошке дозе тироидних хормона ММТ одговорило повећањем масе, и то и апсолутне и релативне. Потом следе добро систематизовани и бројним микрографијама илустровани резултати добијени анализом хистолошких препарата. Најлакше уочљива промена на нивоу светлосне микроскопије била је промена у количини и начину складиштења липида у мрким адипоцитима. Наиме, оба хормона довела су до повећања заступљености липида у односу на контролну групу. Међутим, после Т4-третмана, мултилокуларност је остала на нивоу оне у контролној групи, док је после Т3-третмана дошло до смањења броја липидних тела, уз пораст њихове величине. Поред тога, мрки адипоцити Т4-третираних животиња показали су још неке морфолошке карактеристике метаболички активних ћелија, као што су еухроматски, крупни, централно постављени нуклеуси и јасно истакнути нуклеолуси. У ММТ третираних животиња, нарочито Т4-третираних животиња, често је било могуће уочити ћелије са једним крупним и више ситних липидних тела, тј. унутар исте ћелије постојала је изразита неуједначеност у величини липидних тела. Анализа парафинских пресека бојених методом по Новелију показала је да је ММТ после Т3-третмана наизглед мање прокрвљено, мада ово није потврђено стереолошки. Са друге стране, прегледање пресека бојених методом по Бодијану показало је да је у истој групи редукована инервација, и то и уз крвне судове и уз адипоците. Стереолошком анализом испитиван је утицај примењених третмана на промену заступљености главних ткивних компоненти (мултилокуларни адипоцити, унилокуларни адипоцити, везиво, крвни судови). Статистички значајне разлике нису

показане, највероватније због кратког трајања експерименталног периода. PAS методом бојења приказано је присуство гликогена у цитоплазми мултилокуларних адипоцита после Т3-третмана, односно у цитоплазми мултилокуларних адипоцита, адипоцита са једним крупним и неколико ситних липидних тела, и непотпуно диференцираних адипоцита после Т4-третмана.

Динамика популације мрких адипоцита одређивана је праћењем појаве апоптотских (бојење пропидијум-јодидом) и пролиферативних (имуноекспресија Ki67) догађаја у ткиву, који су у условима оба третмана били на базалном, контролном нивоу. Ектопична, интрацитоплазматска локализација Ki67 показана је у обе третиране групе, али је њен значај остао неразјашњен.

У оквиру имунохистохемијских анализа, поред испитивања присуства Ki67, извршена је и детекција UCP1 као детерминанте термогеног капацитета ММТ, а испитивано је и присуство проинфламаторног цитокина TNF $\alpha$ . Процењено је да је присуство UCP1, повећано после третмана тироидним хормонима, а нарочито је истакнута имунопозитивност у ћелијама са једним крупним и неколико ситних липидних тела, у обе групе животиња третираних хормонима. Присуство TNF $\alpha$  процењено је као приметно повећано после Т4-третмана.

Електронско-микроскопска анализа пружила је детаљнији увид у ултраструктурну организацију ММТ и мрких адипоцита и потврдила или допринела додатном разјашњавању неких од резултата добијених на нивоу светлосне микроскопије. Тако је, на пример, потврђено постојање разлике у начину депоновања липида после Т3-, односно Т4-третмана. Додатни подаци добијени у вези са ремоделирањем капиларне мреже указали су на то да се у ММТ Т4-третираних животиња појавила активација ендотелских ћелија и да се капиларна мрежа реорганизовала пратећи пораст масе ткива, што изгледа није у потпуности био случај у Т3-третираној групи. Потврђено је и да су у Т4-третираној групи капилари по правилу садржали еритроците, што је јасан показатељ појачаног протока крви кроз њих. Присуство кластера незрелих мултилокуларних адипоцита блиско удружених са капиларима, заједно са раније описаним изостанком имуноекспресије Ki67, сугерише да су у моменту окончања експеримента пролиферативни процеси углавном завршени и да се новонастале ћелије налазе у фази стицања морфолошких карактеристика зрелих мултилокуларних адипоцита. Нешто већа заступљеност адипоцита са морфологијом која одговара прелазу између унилокуларних и мултилокуларних адипоцита, посебно после Т4-третмана такође је потврђена електронско-микроскопском анализом.

Ултраструктурном анализом мрких адипоцита показано је да су оба тироидна хормона утицала на динамику постојећих митохондрија, с обзиром на то да се у обе третиране групе појавио плеоморфизам који није карактеристичан за контролу. Ипак, митохондриогенеза није јасно потврђена стереолошки, највероватније због кратког трајања експерименталног третмана. Важан податак који би могао да укаже не само на повећање термогеног потенцијала мрких адипоцита већ и на повећану термогену активност јесте повећање површине контакта митохондрија и липидних тела после Т4-третмана.

У поглављу **Дискусија**, кандидаткиња обједињује резултате релевантне за објашњење одређеног феномена, добијене применом различитих метода, и консеквентно их тумачи у светлу тренутно постојећих литературних података. Захваљујући студиозном приступу и темељном упознавању са раније објављеним радовима који се баве овом или сличном тематиком, кандидаткиња успева да на адекватан начин протумачи већину добијених резултата, међу њима и оне донекле неочекиване као што су, на пример,

немогућност имунохистохемијског потврђивања пролиферативних процеса у ММТ, упркос јасном порасту његове масе или изостанак митохондриогенезе која би била очекивана последица деловања тироидних хормона уопште.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња износи закључке произашле из резултата добијених током израде ове докторске дисертације, од којих Комисија издваја следеће:

- Примењени експериментални третман тироидним хормонима у наведеним дозама и трајању био је одговарајући за успостављање експерименталног модела системског хипертироидизма код пацова.

- Раст ММТ после Т4-третмана усклађен је са ремоделирањем капиларне мреже и одвија се уз одржавање адекватне инервације ткива. То није случај са растом ММТ после Т3-третмана, када изостаје ремоделирање васкуларне мреже, а нервна мрежа се редукује.

- До повећања термогеног капацитета ММТ под утицајем високих доза тироидних хормона долази делом на рачун повећања присуства UCP1 у мрким адипоцитима (постојећим и насталим пролиферацијом), а делом на рачун регрутовања индуцибилних адипоцита.

- Начин на који се липиди депонују у мрким адипоцитима различит је после Т4- у поређењу са Т3-третманом: у првом случају ћелија задржава мултилокуларност, а тиме и спремност да се лакше укључи у термогенезу, док се у другом случају мултилокуларност редукује.

- После Т4-третмана појачава се интензитет контакта митохондрија и липидних тела, што представља морфолошки одраз преузимања масних киселина као термогеног супстрата и активатора UCP1.

Поглавље **Литература** садржи 225 библиографских јединица, међу којима су и најновији литературни подаци. Коришћење литературе у овом обиму показује да је кандидаткиња озбиљно и темељно приступила изради ове докторске дисертације.

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

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

1. Ali Rajab, N. M., Ukropina, M., Cakic-Milosevic, M. (2015) Histological and **M23** ultrastructural alterations of rat thyroid gland after short-term treatment with high doses of thyroid hormones. Saudi J. Biol. Sci. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.05.006>

### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. A. Rajab, N. M., Djurdjevic, M., Ukropina, M., Cakic-Milosevic, M. (2014) **M33** Immunohistochemical localization of TNF $\alpha$  in interscapular brown adipose tissue of hyperthyroid rats. Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Microscopy Congress, Prague, 7-12- September 2014, LS-11-P-1993.

## **Мишљење и предлог Комисије:**

Анализирајући докторску дисертацију **мр Njia Milad Ali Rajab** под насловом „Хистолошке и ултраструктурне промене интерскапуларног мрког масног ткива пацова у експериментално индукованом системском хипертироидизму“ („Histological

**and ultrastructural alterations of rat interscapular brown adipose tissue in experimentally induced systemic hyperthyroidism“**), Комисија сматра да је кандидаткиња успешно остварила постављене циљеве, користећи доступне методе ћелијске и ткивне биологије. Резултати ове тезе показали су да Т3 и Т4, када се примене на начин дефинисан условима овог експеримента, могу да доведу до повећања термогеног капацитета ММТ, а у случају тироксина вероватно и до покретања термогенезе. Ови резултати доприносе проширивању општег фонда знања о биологији ММТ, чиме би у будућности требало да се створе услови за коришћење овог ткива као метаболичког пуфера у лечењу гојазности и поремећаја метаболизма.

Имајући у виду све горе наведено, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације **мр Njia Milad Ali Rajab** под насловом **„Хистолошке и ултраструктурне промене интерскапуларног мрког масног ткива пацова у експериментално индукованом системском хипертироидизму“** („**Histological and ultrastructural alterations of rat interscapular brown adipose tissue in experimentally induced systemic hyperthyroidism“**)

#### **КОМИСИЈА:**

---

др Маја Чакић-Милошевић, доцент,  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

---

др Радмила Глишић, доцент,  
Универзитет у Крагујевцу-  
Природно-математички факултет

---

др Мирела Укропина, доцент  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

У Београду, 30. 10. 2015. год.