

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На **IV** редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној **29.1.2016.** године, прихваћен је извештај ментора др Александре Кораћ, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Александре Јанковић, научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **мр Amal Abdussalam Ali A. Hmaid**, под насловом „Улога **NO**-синтазног пута у структурном ремоделирању миокарда пацова“ (**The role of NO-synthetic pathway in structural remodeling of rat myocardium**) и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: **др Александра Кораћ**, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, **др Александра Јанковић**, научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, **др Бато Кораћ**, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, **др Милица Маркелић**, доцент, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, и **др Милица Лабудовић-Боровић**, доцент, Универзитет у Београду-Медицински факултет.

Пошто је прегледала урађену докторску дисертацију, Комисија Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **мр Amal Abdussalam Ali A. Hmaid** под насловом „Улога **NO**-синтазног пута у структурном ремоделирању миокарда пацова“ (**The role of NO-synthetic pathway in structural remodeling of rat myocardium**) написана је на 103 стране и садржи 51 слику и 5 табела. Текст садржи 7 уобичајених поглавља: **Увод** (16 страна), **Циљеви рада** (2 стране), **Материјал и методи** (7 страна), **Резултати** (45 страна), **Дискусија** (14 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (16 страна).

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** докторске дисертације, у његовом првом делу, **мр Amal Abdussalam Ali A. Hmaid** укратко подсећа на анатомску грађу срца пацова, хистолошке елементе комора и преткомора, а затим детаљно упознаје са хистолошом и цитолошком грађом миокардијума десне коморе, описујући радне кардиомиоците, спроводне, специјализоване кардиомиоците (Пуркињеова влакна) и везивно ткиво интерстицијума. Оригиналним илустрацијама организације кардиомиоцита на нивоу светлосне и трансмисионе

електронске микроскопије кандидаткиња даље приказује саркомерни цитоскелет кардиомиоцита, међућелијске адхезивне везе и електричне синапсе, саркоплазмични ретикулум и присуство великог броја митохондрија. У светлу структуре, објашњена је и основна функција кардиомиоцита.

У наставку уводног дела дисертације, мр Amal Abdussalam Ali A. Hmaid наставља у хипертрофију као ремоделирање срца узроковано како физиолошким, тако и патолошким условима који мењају кардиомиоцитну функцију, јасно раздвајајући типове хипертрофије у односу на то да ли промена захвата десну или леву комору, као и типове хистолошких промена миокарда. Приложен је и тренутно актуелни шематски приказ хипертрофије комора и детаљно су описани до сада познати ћелијски и молекулски механизми који леже у њиховој основи.

Кандидаткиња затим излаже основне податке о физиолошким функцијама азотоксида (NO) у срцу, описујући историјат открића улоге NO у модулирању рада срца као и ензима који учествује у синтези NO, азот оксид синтазе (NOS, *енг.* nitric oxide synthase). Посебна пажња посвећена је присуству, локализацији и компартментализацији изоформи NOS, (ендотелијска – eNOS, неуронална – nNOS и индуцибилна – iNOS) у срцу и кардиомиоцитима, као и њиховој функцији у физиолошким и патолошким стањима. На крају овог дела, кандидаткиња се осврнула и на улогу изоформи NOS у етиологији и одржавању различитих патолошких стања срца. Укратко су изложени и данас веома актуелни подаци о физиолошким стањима хипертрофичног ремоделирања срца у условима излагања и/или аклимације на хладноћу.

Уводни део ове дисертације затвара се разматрањем литературних података везаних за пластичност и ремоделирање десне срчане коморе у физиолошким и патолошким стањима, и изношењем података о „занемарености“ истраживања у односу на обиље података о хипертрофији леве коморе срца, са посебним освртом на још увек недовољно разјашњене ћелијске и молекулске основе.

Постављајући **Циљеве** ове дисертације, кандидаткиња се најпре осврће на податак да новије студије указују да NO може имати битну улогу у оптимизацији адаптивног одговора срца, посебно у односу на дуготрајну (продужену) симпатичку стимулацију. Порекло NO, а посебно утицај симпатичке стимулације на синтезу NO у миокарду, остаје неразјашњен. Познато је такође да је хронично редукован физиолошки ниво NO спрегнут са измењеном функцијом срца и да стога може допринети развоју срчане инсуфицијенције. Хронична инхибиција NOS помоћу L-NAME, (*енг.* N^o-nitro-L-arginine methyl ester) се одавно користи за индуковање хипертензије која доводи до срчане хипертрофије. Ефекти L-NAME укључују уклањање тоничног вазодилаторног ефекта NO, инхибицијом eNOS, као и стимулацију симпатичког нервног система. Међутим, нема података да ли и како L-NAME третман индукује алтерације NO-синтазног пута у самом миокарду, а посебно да ли и како евентуална промена унутарћелијских нивоа NO, инхибицијом и стимулацијом NO синтазног пута, може да измени структурни и функционални одговор миокарда.

Полазећи од ових основа, постављена је експериментална студија чији је основни циљ био расветљавање механизма структурног ремоделирања срца током нормалног

физиолошког одговора на продужену стимулацију симпатичког нервног система, да се окарактерише експресија ензима укључених у синтезу NO, као и да се испита његова улога, модулацијом NO-синтазног пута, како би се испитале основе за развој нових терапеутских приступа, посебно у превенцији развоја и третирању срчане инсуфицијенције.

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 *Mill Hill* соја, који су подељени у две групе, једну аклимирану на хладноћу излагањем ниској температури (4 ± 1 °C) 45 дана и другу аклимирану на собну температуру (22 ± 1 °C). Због познатог утицаја NO на функциони одговор срца, ради поређења ефеката NO у условима базалног срчаног рада и хронично повећане срчане активности праћена је модулација синтезе NO применом супстрата и инхибитора NOS. У ту сврху, обе групе животиња, аклимиране на собну температуру и хладноћу, додатно су подељене у три подгрупе: 1. нетретиране животиње (појене пијаћом водом); 2. животиње појене супстратом NOS, L-аргинин·HCl (2.25%) у пијаћој води; 3. животиње појене инхибитором азот оксид синтаза, L-NAME·HCl (0.01%).

У циљу разумевања доприноса појединих ткивних компоненти структурном ремоделирању миокарда коришћени су хистолошки, цитолошки и молекуларни методи: морфометрија и стереологија, светлосна и електронска микроскопија, имунохистохемија и имунофлуоресценца, као и Western blot. Анализирани су: а) волуменска густина основних ткивних компоненти миокарда, односно волуменска густина кардиомиоцита, капилара и везивног ткива; б) депозиција колагених влакана; в) дијаметар кардиомиоцита као индикатор хипертрофије и структурне карактеристике самих кардиомиоцита: организација миофибрила, величина и изглед нуклеуса, бројност и ултраструктурне карактеристике митохондрија, њихова дистрибуција и однос појединих митохондријалних популација (субсарколемалне, перинуклеусне и интерсарколемалне).

Такође, испитивани су кључни структурни и регулаторни протеини који чине молекулску основу структурног ремоделирања миокарда: протеин укључен у регулацију пролиферације ћелија; протеини укључени у регулацију прокрвљености и ремоделирање капиларне мреже (ендоглин-CD105, васкуларни ендотелијални фактор раста); конексин 43 – један од конексина електричних синапси интеркаларних дискова, важан за пренос акционог потенцијала и ритмичност контракција миокарда; протеини укључени у ремоделирање глатког ендоплазминог ретикулума, SERCA (енг. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase), протеин за прераспodelу Ca^{2+} и калнексин - интегрални протеин ендоплазминог ретикулума; протеини укључени у митохондријалну динамику, њихову фузију и фисију (митофузин и митофилин), као и декуплујући протеин 2 (UCP2, енг. uncoupling protein 2). Такође, испитивана је и експресија кључних ензима укључених у синтезу NO, eNOS, pNOS и iNOS као и експресија хем оксигеназа 1 и 2 (HO-1; HO-2, енг. heme oxygenase-1; heme oxygenase-2), као и апоптоза.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је систематски и јасно изложила резултате до којих је дошла у спроведеним истраживањима. Руководећи се постављеним циљевима резултати су подељени у неколико целина, у којима су на прегледан и сликовит начин

изнети добијени експериментални подаци. У првој целини кандидаткиња показује структурно ремоделирање миокарда – миокардијалну хипертрофију кроз морфометријске и стереолошке податке о уделу три ткивне компоненте миокарда, дијаметру кардиомиоцита, уделу моно- и бинуклеусних кардиомиоцита и односу пролиферативног vs. апоптотског капацитета. У другој целини приказани су резултати ремоделирања капиларне мреже анализом експресије ангиогених маркера и микроскопском анализом капилара на нивоу светлосне и трансмисионе електронске микроскопије. Посебно, анализирана је експресија конексина 43 као мере електричних синапси кардиомиоцита и функције спровођења акционог потенцијала ради правилне контракције. Наредна целина приказује резултате анализе експресије eNOS, nNOS и iNOS и њиховог присуства у кардиомиоцитима и њиховим субкомпаратментима. У петој целини кандидаткиња представља ремоделирање митохондријалне популације анализом три субпопулације митохондрија у кардиомиоцитима, експресијом протеина ремоделирања фузијом и фисијом (митофузини 1 и 2; митофилин), и експресијом UCP2. Такође, анализирано је ремоделирање специфичног глатког, саркоплазмског, ендоплазмског ретикулума.

Последња целина посвећена је запаженим ултраструктурним променама интерстицијума као и депоновању липидних тела и липофусцина у кардиомиоцитима. Због обиља резултата истаћи ћемо само најзначајније резултате и упоредо појединачне **Закључке** до којих је кандидаткиња дошла.

У поређењу са контролним, животиње аклимиране на хладноћу имају значајно нижу експресију транскрипционог фактора пролиферације ћелија. Мада се бележи тренд хипертрофије кардиомиоцита и смањење капиларности, волуменска густина компоненти миокарда десне коморе се не мења код пацова аклимираних на хладноћу, у поређењу са животињама аклимираним на собну температуру. Заједно, резултати не показују значајну хипертрофију десне коморе проузроковане хладноћом, барем не на хистолошком нивоу. Резултати показују да структурне промене након L-аргинин третмана одговарају физиолошкој срчаној хипертрофији. Наиме, L-аргинин третман пацова аклимираних на собну температуру, у поређењу са контролама води хипертрофији кардиомиоцита, праћено истовременим повећањем капиларности и везивног ткива. Међутим, релативни однос компоненти миокарда, количина колагена и структурна организација миофибрила се не мења након L-аргинин третмана, у поређењу са контролним животињама.

Са друге стране, инхибиција ензимске синтезе NO L-NAME третманом резултира појавом фиброзе, односно повећањем волуменске густине везивног ткива уз повећано депоновање колагена у интерстицијуму. Поред тога, упркос смањењу волуменске густине, очигледна је хипертрофија кардиомиоцита. Описане промене су присутне у L-NAME-третираним групама, на собној и ниској температури. У оквиру L-NAME-третираних група, фиброза је израженија у групи пацова аклимираних на хладноћу. Смањена величина нуклеуса кардиомиоцита је детектована у нетретираној групи пацова аклимираних на хладноћу, као и након L-аргинин- и L-NAME- третмана.

Резултати тезе указују да повећање бинуклеарности, заједно са описаним смањењем величине нуклеуса имају битну улогу у хипертрофији кардиомиоцита, као и самог миокардијума. Значајно је да су описане нуклеусне промене најизразитије у L-

NAME-третираним групама. Подаци који се односе на нуклеусне промене и њихову улогу у хипертрофији кардиомиоцита након хроничног L-NAME третмана по први пут су истакнути у овој тези, те су као такви јединствени у литератури.

Осим нуклеусних, значајне ултраструктурне промене уочене су на нивоу митохондријалних популација у свим испитиваним групама; у поређењу са нетретираном групом, смањен површински профил свих митохондријалних субпопулација је забележен у L-аргинин-третираној групи пацова аклимираних на собну температуру. Такође, у поређењу са контролом, смањен површински профил перинуклеусних и интерсаркомералних митохондријалних субпопулација је забележен у групи животиња аклимираних на хладноћу. Међутим, L-аргинин-третирана група пацова аклимирана на хладноћу је имала већи површински профил митохондрија у поређењу са нетретираном групом са хладноће, као и у поређењу са L-аргинин-третираном групом која је боравила на собној температури. Слично, повећан површински профил митохондрија у перинуклеусном и субсарколемалном компартменту, односно смањен у интерсаркомералном региону забележен је у L-NAME-третираној групи животиња аклимираних на хладноћу, у поређењу са истим третманом на собној температури.

Поред тога, испитивање експресије конексина 43, једног од конексина електричних синапси интеркаларних дискова, је показало да се експресија конексина 43 значајно смањује након примењених третмана у поређењу са нетретираном групом на собној температури. Са друге стране, у миокарду пацова аклимираних на хладноћу нема значајних промена у експресији конексина 43 у поређењу са контролним пацовима, као ни након примењених третмана на хладноћи, у поређењу са нетретираном групом са хладноће.

У циљу појашњавања улоге ендogene синтезе NO у приказаном структурном ремоделирању миокарда десне коморе срца пацова испитиване су експресија и локализација NOS. Резултати показују да L-аргинин повећава експресију eNOS, указујући да ова изоформа посредује у продукцији NO у десној комори срца пацова. Са друге стране, L-NAME, поред тога што делује као неспецифични инхибитор NOS, делује и на транслациони ниво конститутивних изоформи, смањујући протеинску експресију nNOS и одржавајући ниво eNOS на контролном нивоу. Обзиром да аклимација на хладноћу повећава eNOS, а супримира експресију nNOS, може се закључити да eNOS има протективну улогу у срчаном afterload-у и последичном развоју хипертрофије десне коморе срца.

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 који до сада нису описани.

Као главни **Закључак** овог поглавља који произилази из појединачно приказаних уз резултате, Комисија издваја:

На основу добијених резултата може се закључити да хронични L-аргинин третман индукује умерену хипертофију десне коморе срца пацова на собној температури и значајно је повећава у условима хроничне стимулације на хладноћи. L-аргинином-индукована вентрикуларна хипертофија се може сматрати физиолошком, обзиром на одсуство фиброзе. Са друге стране, хронична инхибиција NOS, посредована L-NAME је асоцирана са патолошком хипертрофијом миокарда десне коморе са карактеристичним знацима фиброзе, истичући значај деплеције NO у развоју кардиоваскуларне болести.

NO-синтазни систем директно је укључен у структурно ремоделирање миокарда десне коморе срца пацова на нивоу све три хистолошке компоненте: кардиомиоцита, капиларне мреже и везивног ткива, свих ћелијских компоненти: митохондријалних субпопулација, нуклеуса, саркоплазминог ретикулума и електричних синапси. Као водећа изоформа која посредује у продукцији NO у десној комори срца пацова издваја се eNOS док је одсуство експресије iNOS додатан показатељ одсуства патолошког ремоделирања.

У поглављу **Литература** са 137 библиографских јединица релевантних по избору и броју, уз навођење најновијих литературних података, учача се озбиљан и студиозан приступ проблематици од стране кандидаткиње.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Hmaid A.A.A.**, Markelic M., Otasevic V., Masovic S., Jankovic A., Korać B., **M23**
Korac A. (2016) Structural alterations in rat myocardium induced by chronic L- **IF 1.257**
arginine and L- NAME supplementation. *Saudi Journal of Biological Sciences*,
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.022>.

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Hmaid A.A.A.**, Markelic M., Otasevic V., Korać B., Jankovic A., Korac A. **M33**
(2014) Binucleation of rat right ventricle cardiomyocyte induced by chronic
modulation of nitric oxide system and cold acclimation. 18th International
Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, September 7-12, 2014, LS-11-p-
6063.
2. **Hmaid A.A.A.**, Stancic A., Markelic M., Veličković K., Golić I., Otasevic V., **M33**
Vucetic M., Jankovic A., Buzadzic B., Korać B., Korac A. (2011)
Mitochondriogenesis in heart of cold-acclimated rats: the role of nitric oxide. 10th
Multinational Congress on Microscopy, Urbino, Italy, September 4-9, 2011, pp.
313-314.

Мишљење и предлог Комисије:

Анализирајући докторску дисертацију **мр Amal Abdussalam Ali A. Hmaid**, под насловом „Улога NO-синтазног пута у структурном ремоделирању миокарда пацова“ (**The role of NO-synthetic pathway in structural remodeling of rat myocardium**), Комисија

сматра да је кандидаткиња успешно остварила постављене циљеве, користећи доступне методе ћелијске, ткивне и молекуларне биологије. Резултати добијени у овој тези по први пут су показали улогу NO-синтазног пута у структурном ремоделирању миокарда пацова и протективну улогу eNOS у срчаном afterload-у и последичном развоју хипертрофије десне коморе срца. Такође, уочен је и описан пут структурног ремоделирања субћелијских компартмената кардиомиоцита као и интерстицијума и капиларне мреже који координисано одговарају на модулацију NO-синтазног пута.

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 Amal Abdussalam Ali A. Hmaid**, под насловом „Улога NO-синтазног пута у структурном ремоделирању миокарда пацова“ (**The role of NO-synthetic pathway in structural remodeling of rat myocardium**).

КОМИСИЈА:

др Александра Кораћ, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Александра Јанковић, научни сарадник
Универзитет у Београду-Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“

др Бато Кораћ, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Милица Маркелић, доцент
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Милица Лабудовић-Боровић, доцент
Универзитет у Београду-Медицински факултет

У Београду, 12.03.2016. год.