

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 26.11.2018. godine, broj 9700/01-DĆ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj metformina i simvastatina na mitofagiju u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti“

kandidata dr Darka Ćirića, zaposlenog na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Tamara Kravić-Stevović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Akademik Vladimir Bumbaširević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Vladimir Trajković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Miljan Krstić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Darka Ćirića napisana je na ukupno 72 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 tabela, 6 grafikona i 24 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano kakva su oboljenja metabolički sindrom i tip 2 dijabetes melitus, opisane su njihove glavne karakteristike, kriterijumi za postavljanje dijagnoze, koji su faktori rizika i komplikacije bolesti. Opisana je i terapija metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa metforminom i statinima, posebno njihova dejstva na molekularnom nivou.

Detaljno su opisani različiti životinjski modeli koji se koriste za ispitivanje metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa, sa naglaskom na modele koji se temelje na kvalitativno izmenjenoj ishrani.

Detaljno su opisani procesi autofagije i mitofagije, njihove morfološke komponente i molekularni putevi. Opisana su dosadašnja saznanja o ulozi autofagije i mitofagije u patogenezi tip 2 dijabetesa i načinu njihove detekcije u tkivima.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Prvi cilj je ispitivanje uticaja ishrane sa visokim sadržajem masti (HFD) na ultrastrukturne karakteristike subcelularnih struktura, mitofagiju i ekspresiju regulatora autofagije u jetri, aorti i ishijadičnom nervu C57BL/6J miševa. Drugi cilj je ispitivanje uticaja metformina i simvastatina na ultrastrukturne karakteristike subcelularnih struktura, mitofagiju i ekspresiju regulatora autofagije u jetri, aorti i ishijadičnom nervu C57BL/6J miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti (HFD miševi).

U poglavlju **materijal i metode** je detaljno opisano koji soj miševa je korišćen u studiji, na koji način su indukovane karakteristične osobine metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa i način verifikacije ovog eksperimentalnog modela. Detaljno je opisano na koji način su formirane eksperimentalne grupe: tri grupe miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti od kojih je po jedna tretirana metforminom i simvastatinom, i četvrta, kontrolna grupa životinja, ukupno 32 životinje. Ova studija je bila odobrena od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprave za veterinu.

Detaljno je opisan način žrtvovanja, uzimanje i obrada uzoraka za svetlosnu i elektronsku mikroskopiju i za molekularno biološke metode. Objasnjeno je na koji način su izvođene morfometrijske analize na konfokalnom i transmisionom elektronskom mikroskopu, primena „*Systematic Uniform Random Sampling*“ metode biranja delova uzoraka i analiza zapreminskog udela ispitivanih struktura pomoću dvostruke „*coherent point*“ mrežice. Opisan je način detekcije i kvantifikacije autofagijskih vakuola i mitofaga na konfokalnom mikroskopu primenom imunofluorescentnih bojenja sa odgovarajućim antitelima. Primenom imunoblota analizirana je regulacija autofagije kvantifikacijom nivoa ekspresije proteina p62 i LC3. Ekspresija gena uključenih u proces autofagije ispitana je primenom reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 147 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Merenja telesne mase na kraju eksperimenta su pokazala da su miševi iz svih grupa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti imali statistički visoko značajno veću telesnu masu od miševa na standardnom režimu ishrane, ali je zapažen manji porast telesne mase u grupi miševa tretiranoj metforminom. Verifikacija modela je izvedena primenom oralnog testa tolerancije glukoze koji je pokazao bolju kontrolu glikemije kod simvastatinom, a još bolju kod metforminom tretiranih životinja, u poređenju sa netretiranim miševima na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti.

U uzorcima jetre netretiranih miševa bile su prisutne promene u vidu nealkoholnog steatohepatitisa, dok su kod miševa tretiranih metforminom i simvastatinom promene bile konzistentne sa razvojem nealkoholne masne bolesti jetre. Ispitivanja uzoraka jetre i nerva na konfokalnom mikroskopu pokazala su da postoji veći broj mitofaga kod miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti u odnosu na kontrolne miševe, i smanjenje broja mitofaga kod miševa tretiranih simvastatinom. Ispitivanja uzoraka jetre na konfokalnom i transmisionom elektronskom mikroskopu pokazala su da postoji veći broj autofagijskih vakuola u svim eksperimentalnim grupama na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti u poređenju sa kontrolnom grupom. Zapreminski udeo masnih kapi u citoplazmi hepatocita bio je povećan u svim eksperimentalnim grupama na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti, dok je zapreminski udeo lipofaga bio veći samo u grupama tretiranim metforminom i simvastatinom, u poređenju sa kontrolnom grupom.

Broj i procenat aktiviranih Kupferovih ćelija bio je veći kod netretiranih miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti u odnosu na kontrole, dok su grupe tretirane metforminom i simvastatinom imale manji broj i procenat aktiviranih Kupferovih ćelija u jetri. Primećeno je da je procenat Kupferovih ćelija sa lipofazima i masnim kapima u citoplazmi bio povećan samo u netretiranoj grupi miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti.

Netretirani miševi na režimu ishrane sa povećanim sadržajem masti su imali veći broj ultrastrukturno izmenjenih mijelinizovanih vlakana od kontrolnih miševa. U uzorcima nerava miševa tretiranih metforminom detektovan je veći broj oštećenja mijelinizovanih vlakana u odnosu na netretirane HFD miševe, dok je broj oštećenih mijelinizovanih vlakana kod miševa tretiranih simvastatinom bio manji nego kod netretiranih HFD miševa.

Imunoblotom je utvrđeno da je količina LC3 proteina u jetri miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti bila manja nego kod kontrolnih miševa, a da je grupa tretirana metforminom imala veću količinu LC3 proteina u odnosu na netretirane miševe na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti. Količina p62 proteina nije se razlikovala u jetrama ispitivanih grupa miševa.

Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije u jetrama miševa nije pokazalo statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa životinja.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova doktorska disertacija je prvo istraživanje u kome su pokazane promene u mitofagiji u mišjem modelu metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa pod uticajem metformina i simvastatina, često korišćenih lekova u ovim bolestima. Iako su ispitivanja mitofagije kod miševa na izmenjenim režimima ishrane bila tema nedavno publikovanih istraživanja, objavljeni rezultati nisu u potpunosti razjasnili ovu pojavu (Sun i sar., 2015; Dethlefsen i sar., 2018). U dosadašnjim istraživanjima mitofagije kod miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti dobijeni su na prvi pogled suprotstavljeni rezultati, interpretirani od strane Suna i saradnika kao smanjenje mitofagije kod miševa hranjenih HFD-om (Sun i sar., 2015), odnosno kao povećanje mitofagije u studiji Dethlefsen-a i saradnika kod miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti i fruktoze (Dethlefsen i sar., 2018). Povećan broj i zapreminski udeo autofagijskih vakuola u citoplazmi hepatocita i povećan broj LC3B/p62 i LC3B/LAMP1 kolokalizacijskih punkta u jetri na konfokalnom mikroskopu, zajedno sa smanjenom količinom LC3-II proteina na imunoblotu, ukazuju na smanjenu indukciju i prisutnu blokadu kasnih faza autofagije u hepatocitima HFD miševa. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju, zajedno sa nedavno objavljenim podacima o disfunkciji lizozoma koja je prisutna u tip 2 dijabetesu (Quian i sar., 2018), pružaju čvrstu teorijsku osnovu za objašnjenje promena koje se javljaju u mitofagiji u tip 2 dijabetesu, kao i pojašnjenje do sada objavljenih rezultata istraživanja koja su se bavila ovom problematikom.

Izostanak uticaja metformina, aktivatora autofagije (Volarevic i sar., 2015), na broj mitofaga kod životinja na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti mogao bi da bude povezan sa odvojenom regulacijom neselektivne autofagije i mitofagije, te da se tumači kao izostanak indukcije mitofagije u ovom modelu. Takođe, s obzirom na direktno dejstvo metformina na mitohondrije u smislu inhibicije respiratornog lanca (Hur i Lee, 2015), kao i predloženo promovišuće dejstvo metformina na mitofagiju u hepatosteatozi (Song i sar., 2016), ne može se isključiti mogućnost da je u ovim eksperimentima aktivacija mitofagije dostigla svoj maksimalni kapacitet kod životinja na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti i bez dodatnih stimulusa kao što je metformin. Izostanak vidljivih efekata metformina mogao bi se objasniti i mogućom pojavom blokade mitofagije u ispitivanom modelu.

Posebno je značajan rezultat smanjenja broja mitofaga u grupi životinja tretiranoj simvastatinom, što bi moglo biti posledica otklanjanja postojećeg bloka u mitofagiji ili inhibicije prethodno aktivirane mitofagije. Ipak, s obzirom na i dalje prisutnu blokadu autofagije, na šta ukazuje povećan zapreminski udeo u citoplazmi autofagijskih vakuola i smanjenu indukciju autofagije na koju ukazuje smanjenje LC3-II ekspresije dobijeno imunoblotom, manji broja mitofaga u grupi životinja tretiranoj simvastatinom verovatno je povezan sa mogućim protektivnim i korisnim efektima statina na mitohondrije.

I terapija metforminom i terapija simvastatinom su doveli do bolje regulacije glikemije i prevencije nealkoholnog steatohepatitisa kod ispitivanih životinja. Ovaj rezultat bi mogao biti povezan sa mitoprotektivnim, antiinflamatornim ili efektima simvastatina na inhibiciju endogene sinteze holesterola, kao i sa smanjenjem broja i aktivacije Kupferovih ćelija u jetri, za koje je u prethodnim istraživanjima pokazano da imaju ulogu u patogenezi insulinske rezistencije u tip 2 dijabetesu (Lanthier i sar, 2010).

U ovom istraživanju opisani su povoljni efekti simvastatina i na neuropatiju koja se javlja kod životinja u ovom eksperimentalnom modelu, a koji su detektovani u ovoj studiji kao smanjenje oštećenja mijelinskog omotača kod miševa tretiranih simvastatinom. Međutim, tretman metforminom doveo je do povećanja broja oštećenih vlakana u poređenju sa grupom miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti. Oštećenja mijelina koja su prisutna kod netretiranih miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti i kod miševa tretiranih metforminom, a u grupi tretiranoj simvastatinom smanjena na nivo koji je bio prisutan u kontrolnim životinjama, verovatno nisu posledica povoljnih efekata simvastatina na

metabolizam glukoze, jer metformin, koji dovodi do najbolje kontrole glikemije dovodi do najvećeg oštećenja mijelinskog omotača.

Ovi rezultati imaju poseban značaj kada se ima u vidu da je upotreba statina kod pacijenata sa tip 2 dijabetesom praćena određenim kontroverzama, koje su o vezi sa podacima da lečenje hiperlipidemije statinima može da dovede do povećane učestalosti javljanja tip 2 dijabetesa kod pacijenata koji prethodno nisu bolovali od ove bolesti. (van Stee i sar., 2018; Agouridis i sar., 2015; Robinson, 2015) U tom smislu pokazani neuroprotektivni efekti i moguća mitoprotektivna dejstva u hepatocitima predstavljaju dodatne argumente koji govore u prilog sadašnjeg konsenzusa o upotrebi statina u tip 2 dijabetesu.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. *Ciric D, Martinovic T, Petricevic S, Trajkovic V, Bumbasirevic V, Kravic-Stevovic T. **Metformin exacerbates and simvastatin attenuates myelin damage in high fat diet-fed C57BL/6 J mice.** Neuropathology. 2018; 38:468-474. (M22, IF 1,887)*

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj metformina i simvastatina na mitofagiju u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti“ dr Darka Ćirića, je prema našim saznanjima, prvi rad koji opisuje promene u mitofagiji kod C57BL/6J miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti tretiranih metforminom i simvastatinom koristeći savremene analize koje obuhvataju detekciju i kvantifikaciju autofagijskih vakuola koje sadrže mitohondrije. Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji su, prema našim saznanjima, po prvi put pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa pokazani neuroprotektivni efekti simvastatina na mijelinski omotač u perifernim nervima, kao i promene u broju Kupferovih ćelija koje prate oštećenja u jetri u vidu nealkoholnog steatohepatitisa kod netretiranih miševa. Doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju kompleksnih događaja u patogenezi metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa i korak ka boljem razumevanju subcelularnih i tkivnih promena koje se javljaju kod obolelih miševa tretiranih metforminom i simvastatinom. Detektovanje i kvantifikovanje promena u mitofagiji, stepena oštećenja mijelinskog omotača u perifernim nervima i rasvetljavanje uloge Kupferovih ćelija u patogenezi ispitivanih bolesti može imati potencijalni klinički značaj, pre svega u razumevanju promena koje bolest izaziva na nivou ćelija i novootkrivenih efekata metformina

i statina u razvoju ovih promena i uticaju na komplikacije bolesti. Ova nova saznanja bi mogla dovesti do razvoja novih terapijskih protokola koji bi bili usmereni ka optimalnijem lečenju i sprečavanju razvoja dijabetične neuropatije kod obolelih pacijenata.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Darka Ćirića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, _____ godine

Članovi Komisije:

Akademik Vladimir Bumbaširević

Prof. dr Vladimir Trajković

Prof. dr Miljan Krstić

Mentor:

Prof. dr Tamara Kravić-Stevović
