

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.10.2016. године, прихваћен је извештај менторки проф. др Биљане Стојковић и др Јелице Лазаревић о урађеној докторској дисертацији **Мирка С. Ђорђевића**, истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом „Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога митохондрија и оксидативног стреса“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: проф. др Биљана Стојковић, ванредна професорка Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелица Лазаревић, научна саветница Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, др Дарка Шешлија Јовановић, виша научна сарадница Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и др Анђелко Петровић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

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

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Мирка С. Ђорђевића** под насловом „Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога митохондрија и оксидативног стреса“, написана је на 218 страна, и подељена у 9 поглавља: **Увод** (35 страна), **Циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (30 страна), **Резултати** (27 страна), **Дискусија** (39 страна), **Закључци** (2 стране), **Табеле** (28 страна), **Слике** (25 страна) и **Литература** (30 страна). Рад садржи 319 литературних цитата, 25 слика, 36 табела, **Садржај**, као и **Сажетак** на српском и енглеском језику.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи укупно осам потпоглавља у којима се на разумљив и интересантан начин постављају теоријске основе докторске дисертације и даје релевантан приказ досадашњих литературних сазнања која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Потпоглавље „**Еволуционе теорије старења**“ прецизно дефинише савремену еволуциону теорију старења и описује два експериментална приступа који се у савременој биологији користе за тестирање њених теоријских претпоставки, а то су експерименталне манипулације временом репродукције и стопама екстринзички индукованог морталитета. У потпоглављу „**Популационо-генетички механизми у основи еволуције старења**“ подробно су описана два популационо-генетичка механизма која се налазе у основи еволуционе теорије старења: 1) акумулација мутација и 2) антагонистичка плејотропија. У овом

одељку пажња је посвећена и физиолошки специфичној варијанти антагонистичке плејотропије - моделу једнократне коме. Описани популационо-генетички механизми пружају теоријску основу за разумевање специфичности тзв. касног живота, тј. заустављања демографског старења у касним фазама животног циклуса, што је једно од најинтересантнијих открића у савременој биологији. С обзиром на то да еволуциона теорија и популационо-генетички механизми који се на њу ослањају пружају теоријски контекст за сагледавање универзалних физиолошких механизма у процесу старења код филогенетски удаљених врста, у наредном потпоглављу **„Физиолошке теорије старења“** дат је систематичан приказ физиолошких теорија старења, међу којима значајно место има митохондријска слободно радикалска теорија старења. Сажет опис структурних особина митохондрија, као и детаљан опис ензимских комплекса електрон транспортног ланца (ЕТЛ) и АТФ синтазе које заједно чине систем за оксидативну фосфорилацију дат је у потпоглављу **„Митохондрије“**. Будући да митохондријски ЕТЛ представља место највеће синтезе реактивних врста молекулског кисеоника (мРОС), у овом одељку представљени су и механизми продукције мРОС-ова и регулације њихове концентрације активношћу антиоксидативних ензима и неензимских антиоксиданата. У наредном потпоглављу **„Митохондријска теорија старења (МФРТА)“** дат је преглед радова који подржавају, али и указују на одступања од претпоставки ове теорије. Потпоглавље **„Сви путеви воде у митохондрију, а неки и из ње – улога мРОС-ова у сигналној трансдукцији“** истиче да поред изазивања оксидативних оштећења, мРОС-ови као секундарни гласници имају важну улогу у антероградним (из једра ка митохондријама) и ретроградним (из митохондрија ка једру) сигналним путевима. Посебан акценат у овом одељку стављен је на опис улоге мРОС-ова у процесу митохормезе. У потпоглављу **„Концепт постепеног одговора на мРОС“** јасно је дефинисан овај феномен и објашњава се на који начин митохондрије и мРОС-ови, преко специфичног прага мРОС-ова, учествују у еволуционој оптимизацији зајамних ограничења особина животне историје. Коначно, потпоглавље **„Од круског сведока до главног осумњиченог - обликовање варијабилности мтДНК еволуционим процесима“** приказује резултате студија који су променили еволуциону „митохондријску парадигму“ - од неутралности мтДНК до сазнања да на варијабилност митохондријског генома значајне ефекте има природна селекција. У том контексту, кроз јасан опис феномена, као што су селекција за међугеномску подударност (тј. коеволуција једарног и митохондријског генома), полно-специфична селекција и негативна селекција зависна од учесталости, приказана је комплексност процеса обликовања варијабилности мтДНК унутар популације. Посебна пажња посвећена је разумевању модела материнске клетве, који код мужјака може утицати на акумулацију штетних митохондријских мутација са негативним ефектом на старење и друге особине животне историје.

У оквиру поглавља **Циљеви**, изнет је општи циљ докторске дисертације који истиче значај повезивања проксималних и ултимативних узрока еволуционих образаца старења. Из општег циља изведени су и специфични циљеви који на јасан и прецизан начин дефинишу главне правце докторске дисертације.

Поглавље **Материјал и методе** садржи укупно десет потпоглавља. Овако структурирано, поглавље **Материјал и методе** подробно описује коришћени модел организам и указује на његову погодност у тестирањима еволуционих и физиолошких теорија старења. Пружен је детаљан увид у научну методологију и истакнуте су предности примењених истраживачких приступа. Потпоглавље **„Биологија и основне карактеристике животног циклуса пасуљевог жишка“** даје детаљан опис пасуљевог жишка, *Acanthoscelides obtectus*, као модел организма у докторској дисертацији. У

потпоглављу „*Узрасно-специфична селекција и лабораторијске популације*“ описане су лабораторијске популације пасуљевог жишка које су селектоване током више од 170 генерација за рану (Е режим) или касну (Л режим) репродукцију. Прецизирани су и услови гајења експерименталних популација. У наредном потпоглављу „*Анализа ефеката селекције за рану и касну репродукцију на преадултне и адултне особине животне историје*“ описана је експериментална методологија која је коришћена приликом процењивања преадултних и адултних особина животне историје. Додатно, приказан је Хамилтонов модел којим су процењивани интензитети природне селекције у различитим фазама животног циклуса. Наредна три потпоглавља, „*Експериментална анализа популационо-генетичког модела акумулације мутација*“, „*Анализа утицаја митохондрија, једра и њихових еписматичких интеракција на особине животне историје*“ и „*Тестирање отпорности на оксидативни стрес*“, детаљно приказују експерименталну методологију сваког од три урађена експеримента. Наиме, формирањем двоструких хибрида тестиране су претпоставке модела акумулације мутација, док су експерименталним приступом повратног укрштања и формирањем мито-једарних линија на јасан начин анализирани одвојени ефекти митохондрије, једра и њихове интеракције на еволуцију различитих особина животне историје. У основи експерименталног приступа 24-часовног третмана паракватом и тебуфенпирадом, била је идеја да се тестира ефекат краткотрајног екстринзичког оксидативног стреса на преживљавање и дужину живота лабораторијских популација пасуљевог жишка, као и мито-једарних линија. Потпоглавља „*Одређивање активности ензима митохондријског електрон транспортног ланца*“ и „*Молекулска карактеризација лабораторијских популација пасуљевог жишка*“ пружају увид у научну методологију одређивања активности комплекса електрон транспортног ланца и молекулске анализе микросателитских локуса и митохондријског гена за субјединицу I цитохром ц оксидазе. Коначно, у потпоглављима „*Демографске анализе*“ и „*Статистичка обрада података*“ описани су математички модели морталитета и варијационе и корелационе статистичке процедуре примењене у анализи узрока варирања анализираних особина.

Поглавље **Резултати** подељено је на укупно осам потпоглавља. У потпоглављу „*Анализа особина животне историје лабораторијских популација пасуљевог жишка*“ указано је на изражене разлике у преадултним и адултним особинама животне историје између лабораторијских популација селектованих за рану и касну репродукцију. Демографске анализе показале су да је разлика у динамици старења између дугоживећих Л и краткоживећих Е јединки превасходно последица смањења стопе старења. Резултати анализе дужине живота и репродуктивних особина женки и мужјака нехибридних Е и Л популација и њихових одговарајућих двоструких хибрида у потпоглављу „*Анализа појаве хибридног вигора у особинама дужине живота и репродуктивног понашања лабораторијских популација пасуљевог жишка*“ потврдили су да је акумулација мутација била важан механизам у еволуцији старења Е, али не и Л жижака. У наредном потпоглављу „*Анализа осетљивости експерименталних популација на оксидативни стрес*“ указује се да постоји позитивна корелација између дужине живота и отпорности на оксидативни стрес, односно да су каснорепродукујући Л жишци отпорнији на оксидативни стрес од ранорепродукујућих Е жижака. Уједно, показано је да третман генераторима оксидативног стреса смањује дужину живота повећавањем иницијалног морталитета за којим следи смањење стопе старења. Такође, установљено је да су женке отпорније на оксидативни стрес од мужјака, као и да ниске концентрације пестицида могу

резултирати продужењем живота, односно хормезом. У потпоглављу **„Генетички диверзитет и популационо-генетичка структура лабораторијских популација“** резултати молекулских анализа лабораторијских популација пасуљевог жишка јасно показују да је вишегенерацијска узрасно-специфична селекција узроковала значајну дивергенцију у митохондријским и једарним молекулским маркерима. Потпоглавље **„Анализа особина животне историје мито-једарних линија“** истиче да је нарушавање мито-једарних интеракција превасходно негативно утицало на преадултне особине, док је скраћивање живота код мито-једарних линија са нарушеним мито-једарним интеракцијама детектовано тек након репродуктивне активности. У потпоглављима **„Анализа активности ензимских комплекса митохондријског ЕТЛ“** и **„Анализа повезаности особина животне историје мито-једарних линија и активности комплекса митохондријског ЕТЛ“** издвајају се три важна резултата: 1) изражене разлике у активности комплекса III указују да је дивергенција у животним стратегијама Е и Л режима повезана са променом у активности комплекса митохондријског електрон транспортног ланца, 2) значајан пад активности сва четири комплекса ЕТЛ код мито-једарних линија са нарушеним у поређењу са линијама са реконституисаним мито-једарним интеракцијама указује да је дивергенција у митохондријским биоенергетским процесима обликована мито-једарном коеволуцијом, 3) мултиваријантна регресиона анализа показала је да активност комплекса II, III и IV описује више од 65 % варијабилности у дужини живота, стопи старења, али и других особина животне историје мито-једарних група, што јасно потврђује да активност митохондријског ЕТЛ лежи у основи еволуције животних стратегија пасуљевог жишка. Коначно, потпоглавље **„Анализа осетљивости мито-једарних линија на оксидативни стрес“** износи резултате о отпорности на благи екстринзички оксидативни стрес (паракуват и тебуфенпирад) мито-једарних линија са нарушеним и реконституисаним епистатичким интеракцијама. Већа отпорност линија које поседују мито-једарну неподударност указује на повезаност интринзичког оксидативног стреса и могуће активације механизма одбране од оксидативног стреса код линија пасуљевог жишка.

Поглавље **Дискусија** подељено је на укупно осам потпоглавља и представља упоредну анализу оригиналних резултата докторске дисертације и релевантних теоријских и емпиријских сазнања. Анализа резултата ове студије подељена је у две главне тематске целине које су оријентисане на истраживање ултимативних (еволуционих) и проксималних (физиолошких) узрока старења. Прва тематска целина обухваћена је потпоглављима **„Двадесет година лабораторијске еволуције за различито време репродукције код пасуљевог жишка – шта се променило?“**, **„Процес старења еволуира код лабораторијских популација пасуљевог жишка селектованих за различито време репродукције - потврда савремене еволуционе теорије старења“**, **„Популационо-генетички механизми у основи еволуционе теорије старења код експерименталних популација пасуљевог жишка“**, **„Улога сексуалног конфликта у еволуцији полно-специфичних разлика у дужини живота“** и **„Жртвовање механизма одржавања коме зарад репродукције - повезаност узрасно-специфичне селекције и отпорности на оксидативни стрес“** и бави се еволуционим питањима настанка и трансгенерацијског моделовања специфичних образаца старења у популацијама које су изложене различитим селективним притисцима. У том контексту, тестиране су претпоставке савремене еволуционе теорије старења, као и популационо-генетичких модела који се на њу ослањају: антагонистичке плејотропије (АП) и акумулације мутација (АМ). Резултати студије неспорно су потврдили да динамика старења еволуира сходно обрасцу деловања

селекције. Наиме, ограничавање репродукције на раније узрасте (прва два дана) у Е селекционом режиму резултирало је ранијим отпочињањем слабљења селекције и еволуцијом убрзаног старења. Услед скраћеног периода интензивног деловања селекције нису биле фаворизоване антагонистички плејотропне мутације са позитивним дејством у ранијем узрасту, али је омогућена акумулација мутација са штетним ефектима у ранијем узрасту. С друге стране, селекција за касну репродукцију (након десетог дана) у Л режиму резултирала је еволуцијом веће дужине живота и продужењем периода интензивног деловања селекције у коме су ефикасно елиминисане мутације са штетним узрасно-специфичним ефектима и фаворизоване АП мутације. Уједно, анализе уласка кривих морталитета у плато показале су да, у сагласности са претпоставкама еволуционе теорије старења, криве морталитета прате образац промене интензитета селекције. Детекција полно-специфичне осетљивости репродуктивних особина на инбридинг унутар Е селекционог режима, као и неочекивана појава хетерозе у репродуктивним особинама женки и мужјака унутар Л режима, указали су да, поред природне селекције, важну улогу у еволуцији полног диморфизма у дужини живота има и сексуална селекција. Налаз веће отпорности на екстринзички оксидативни стрес изазван паракватом и тебуфенпирадом дугоживећих-каснорепродукујућих Л жижака, у поређењу са краткоживећим-ранорепродукујућим Е жишцима, потврдио је претпоставке еволуционог модела једнократне коме који предвиђа расподелу енергије између функција репродукције и одржавања коме. Друга тематска целина обухваћена је потпоглављима *„Провера сведока и проналажење осумњичених: Узрасно-специфична селекција обликује учесталост митохондријских и једарних алела, као и митохондријске биоенергетске процесе“*, *„Позиви М×Н ради еволуције животне стратегије: Улога мито-једарних епистатичких интеракција у еволуцији старења и других особина животне историје“* и *„Сметње на вези: ефекат (не)правилне комуникације митохондрије и једра на преживљавање и дужину живота у хомеостазу и након екстринзичког оксидативног стреса“* и односи се на разумевање непосредних узрока који повећавају вероватноћу умирања током живота, као и индивидуалних генетичких разлика које представљају материјал за деловање еволуционих механизма. Општи закључак заснован на генетичкој анализи митохондријског и једарног генома јесте да у молекулској основи различитих животних стратегија Е и Л режима лежи значајна дивергенција у варијабилности митохондријске и једарне ДНК. Ови закључци су додатно потврђени биохемијским анализама активности митохондријског ЕТЛ према којима се дивергентни ефекат детектованих хаплотипова највише испољава кроз активности комплекса III. На овај начин демонстрирана је повезаност узрасно-специфичне селекције и еволуције старења са обликовањем учесталости мтДНК хаплотипова и промене биоенергетских својстава митохондрија. Експериментална методологија повратног укрштања и формирање мито-једарних линија са нарушеним и реконституисаним епистатичким интеракцијама имало је за циљ да испита да ли су мито-једарне интеракције важна јединица на коју је деловала узрасно-специфична селекција. Резултати анализе преадултних и адултних особина мито-једарних линија, као и спектрофотометријске анализе активности сва четири комплекса ЕТЛ, јасно указују да је дивергенција у животним стратегијама и митохондријским биоенергетским процесима обликована мито-једарном коеволуцијом. Коначно, имајући у виду да су ефекти мито-једарних интеракција на дуговечност зависили од биотичких (репродуктивна активност) и абиотичких (третман пестицидима) фактора, неспоран закључак ове студије је да се сложеност фенотипског ефекта митохондријске генетичке варијабилности, која је зависна од епистатичких интеракција са једарним геномом, може сагледати искључиво у контексту конкретних услова животне средине.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци засновани на анализама добијених експерименталних резултата. Закључено је да специфична динамика процеса старења лабораторијских популација пасуљевог жишка еволуира у складу са обрасцима деловања узрасно-специфичне селекције. Такође, значајну улогу у еволуцији дужег живота у Л режиму имају мутације са антагонистички-плејотропним ефектом, док у еволуцији краћег живота Е жижака важну улогу има акумулација мутација у генима који се налазе у основи ове особине животне историје. На основу теоријских предвиђања модела оптимизације енергетске расподеле на различите животне функције, може се закључити да еволуција дужег живота подразумева веће улагање ресурса у механизме одржавања сомe, умањујући алокацију енергије у рани фекундитет. Еволуција супротне стратегије оптимизационог модела уочена је код јединки популација селектованих за рану репродукцију. Пад активности митохондријског ЕТЛ комплекса и лошије преадултне перформансе јединки из линија са нарушеним мито-једарним интеракцијама, а у односу на линије са реконституисаним епистатичким интеракцијама, указују да су мито-једарне интеракције важна јединица на коју је деловала узрасно-специфична селекција током еволуције дивергентних животних стратегија. Уједно, ови резултати представљају „механистичку“ потврду уочене повезаности еволуције старења са обликовањем мтДНК хаплотипова и променама биоенергетских својстава митохондрија.

Поглавље **Табеле** приказује укупно 36 табела. Свака табела има адекватан опис и на адекватан начин прати представљене резултате докторске дисертације.

Поглавље **Слике** садржи укупно 25 слика. Графичко приказивање резултата изведено је јасно и прегледно. Описи слика су разумљиви и сами за себе описују представљене резултате.

Поглавље **Литература** садржи листу од 319 библиографских јединица. Наведене научне публикације су актуелне, односе се на области које су од значаја за урађену дисертацију и коришћене су на прикладан начин доприносећи општем разумевању садржаја докторске дисертације.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

М21а:

1. Stojković B., Đorđević M., Janković J., Savković U., Tucić N. (2015). Heterosis in age-specific selected populations of a seed beetle: Sex differences in longevity and reproductive behavior. *Insect Science*, 22(2), 295-309. ИФ: 2,55

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1744-7917.12115/full>

M21:

2. **Đorđević M.**, Stojković B., Savković U., Immonen E., Tucić N., Lazarević J., Arnqvist G. (2016). Sex-specific mitonuclear epistasis and the evolution of mitochondrial bioenergetics, ageing and life history in seed beetles. *Evolution*, doi: 10.1111/evo.13109. ИФ: **4,61**

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evo.13109/full>

3. Stojković B., Sayadi A., **Đorđević M.**, Jović J., Savković U., Arnqvist G. (2016). Divergent evolution of lifespan associated with mitochondrial DNA evolution. *Evolution*, doi: 10.1111/evo.13102. ИФ: **4,61**

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evo.13102/full>

4. Šešlija Jovanović D., **Đorđević M.**, Savković U., Lazarević J. (2014). The effect of mitochondrial complex I inhibitor on longevity of short-lived and long-lived seed beetles and its mitonuclear hybrids. *Biogerontology*, 15(5), 487-501. ИФ: **3,29**

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10522-014-9520-5>

5. Lazarević J., **Đorđević M.**, Stojković B., Tucić N. (2013). Resistance to prooxidant agent paraquat in the short- and long-lived lines of the seed beetle (*Acanthoscelides obtectus*). *Biogerontology*, 14(2), 141-152. ИФ: **3,34**

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10522-013-9417-8>

M22:

6. **Đorđević M.**, Savković U., Lazarević J., Tucić N., Stojković B. (2015). Intergenomic interactions in hybrids between short-lived and long-lived lines of a seed beetle: Analyses of life history traits. *Evolutionary Biology*, 42(4), 461-472. ИФ: **3,27**

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11692-015-9340-9>

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата **Мирка С. Ђорђевића**, под насловом „Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога митохондрија и оксидативног стреса“ представља свестрано урађен научни рад утемељен у најновијим сазнањима из области еволуционе биологије. Дисертација садржи јасно формулисане циљеве који су засновани на добром познавању научне проблематике. Имајући у виду да се тема докторске дисертације односи на нове правце истраживања о значају узрасно-специфичне селекције у еволуцији старења кроз промене биоенергетских својстава митохондрија, односно коеволуцију митохондријског и једарног генома, може се закључити да резултати ове дисертације представљају оригинални научни допринос разумевању процеса старења, проксималних и ултимативних узрока старења, као и улоге коју у том процесу имају енергетски метаболизам и оксидативни стрес. О томе говоре и публикације у врхунским међународним часописима које су објављене на основу резултата ове дисертације. Ова актуелна тематика може бити успешно развијана кроз даљи рад **Мирка С. Ђорђевића**.

Током израде дисертације **Мирко С. Ђорђевић** је показао изузетне вештине у реализацији истраживачког поступка експерименталне еволуције, висок степен самосталности у експерименталном раду, дефинисању хипотеза и циљева рада, обради добијених података и теоријски заснованом тумачењу резултата студије.

На основу увида у експериментални рад, прегледане докторске дисертације и постигнутих резултата, Комисија закључује да су задаци, постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, у потпуности испуњени и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватање позитивне оцене докторске дисертације **Мирка С. Ђорђевића** под насловом „Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога митохондрија и оксидативног стреса“ и кандидату омогући јавну одбрану рада.

У Београду, _____ 2016. године.

КОМИСИЈА:

др Биљана Стојковић, ванредна професорка,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Јелица Лазаревић, научна саветница,
Универзитет у Београду-Институт за за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Дарка Шешлија Јовановић, виша научна сарадница
Универзитет у Београду-Институт за за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Анђелко Петровић, ванредни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет