

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 10.09.2021. године, на основу молбе ментора, **др Александре Кораћ**, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и **др Александре Јанковић**, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Марије Н. Алексић**, истраживача сарадника на Институту за зоологију Биолошког факултета под насловом: „**Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму индукованом метимазолом**“, у саставу: **др Александра Кораћ**, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, **др Александра Јанковић**, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију и **др Бато Кораћ**, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет и научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Марије Н. Алексић** под насловом „**Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму индукованом метимазолом**“ је написана на 129 страна и састоји се из следећих поглавља: Увод (20 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методи (9 страна), Резултати (58 страна), Дискусија (15 страна), Закључци (1 страна) и Литература (25 страна). Дисертација садржи 28 слика и то: 2 у поглављу Увод и 26 у поглављу Резултати. Дисертација садржи 2 схеме у поглављу Увод, 6 табела и то: 3 у поглављу Материјал и методи и 3 у поглављу Резултати и 13 графикона у поглављу Резултати. Дисертација садржи и 12 уводних страна и то: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику и садржај. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Анализа докторске дисертације

У Уводу докторске дисертације детаљано је кроз више потпоглавља описана пероксизомална популација у различитим ћелијама животиња, биљака и квасаца као и њихово порекло. Такође је показано историјски мењано мишљење о различитим врстама пероксизома, различитим облицима, броју и функцији који доприносе њиховој изузетној хетерогености. Затим је објашњена биогенеза пероксизома и описани путеви биогенезе са акцентом на учешће митохондрија у њима. Детаљно су истакнута сазнања која се односе на регулацију биогенезе пероксизома, пероксидазију и улогу пероксизома у метаболизму сисара, посебно у оксидацији масних киселина. Надаље, дат је јасан преглед који се односи на тироидне хормоне, њихове рецепторе, механизме регулације физиолошких процеса, као стање хипотироидизма. То је праћено детаљним описом и прегледом улоге коју мрко масно ткиво има код животиња, са акцентом на улогу код човека. Механизми термогене активације мрког масног ткива и улога коју у томе имају тироидни хормони, описани су детаљно. Такође, у уводу је на основу постојећих сазнања описана веза хипотироидизма и мрког масног ткива са метаболичком и редокс хомеостазом. Истакнута је разложно улога коју пероксизоми у мрком масном ткиву имају у одржању целокупне хомеостазе.

Мрко масно ткиво је главно место регулације укупне енергетске хомеостазе. Представља високо специјализован орган који користи енергију ускладиштену у форми липида за продукцију топлоте у процесу термогенезе. Новије студије показале су присуство мрког масног ткива и код одраслих људи што је отворило питање његове улоге у регулацији енергетског метаболизма и етиологији метаболичких обољења попут гојазности, дијабетеса типа 2 и инсулинске резистенције. Сви важни аспекти функције мрког масног ткива, генска експресија, доступност нутријената, липогенеза/липолиза, термогенеза, антиоксидативна одбрана, биогенеза органела, регулисани су тироидним хормонима.

Добро је познато да хипотироидни пацови током аклимације на хладноћу показују неотпорност у различитом степену. Са друге стране, у мрком масном ткиву пацова хипотироидизам делимично подражава ефекте хроничног излагања хладноћи. Термогена активација мрког масног ткива је изузетно сложен процес који се одликује повећаном метаболичком активношћу ткива, прокрвљеношћу, ремоделирањем капиларне мреже, пролиферацијом/диференцијацијом мрких адипоцита и ремоделирањем органела.

Иако се зна да хипотироидизам индукује пролиферацију пероксизома у јетри, подаци о присуству и функцији пероксизома у мрком масном ткиву су малобројни. Објављене студије су углавном испитивале улогу пероксизома у липидном метаболизму и њиховој сарадњи са митохондријама у процесу β -оксидације масних киселина током термогенезе. Међутим, порекло пероксизома и путеви њихове биогенезе у мрким адипоцитима у контексту метаболизма измењеног хипотироидизмом остали су неразјашњени.

Имајући то у виду, постављени су **Циљеви** докторске дисертације:

- Испитивање утицаја системског хипотироидизма на ремоделирање мрког масног ткива и мрких адипоцита;
- Праћење динамике пероксизома која подразумева биогенезу пероксизома и њихово одстрањивање;
- Испитивање начина на који долази до биогенезе пероксизома у условима хипотироидизма;
- Испитивање путева биогенезе пероксизома у мрким адипоцитима;
- Разматрање структурне и функцијске повезаности пероксизома са другим органелама у мрким адипоцитима (митохондрије, ендоплазмични ретикулум, липидна тела);
- Расветљавање промена антиоксидативне одбране и молекулских механизма у њиховој основи;
- Расветљавање утицаја хипотироидизма на термогену активацију мрког масног ткива.

У поглављу **Материјал и методи**, приказане су и детаљно описане коришћене методе. Кандидаткиња је у првим потпоглављима описала коришћене експерименталне животиње, модел индукције хипотироидизма као и изоловање ткива и лаке митохондријске фракције обogaћене пероксизомима. Затим је описана припрема ткива за анализу на нивоу светлосне, конфокалне и електронске микроскопије. Овде је важно истаћи да је кандидаткиња применила осетљив и специфичан метод за приказивање пероксизома на нивоу ултраструктуре.

Даље је описано изоловање и припрема протеина за анализу Western blott методом; SDS-PAGE електрофореза; Western blott и детекција и анализа протеина након њега; методе за одређивање активности ензима антиоксидативне одбране и количине глутатиона; припрема крвног серума и плазме; одређивање концентрације протеина; одређивање концентрације биохемијских параметара; одређивање концентрације тироидних хормона и TSH; припрема ткива за светлосну и конфокалну микроскопију; припрема ткива за електронску микроскопију; локализација протеина микроскопским методима; имунохистохемијска локализација протеина; имунофлуоресцентна локализација протеина; имуноголд локализација протеина; стереолошке и морфометријске анализе, као и примењене статистичке анализе.

Резултати докторске дисертације се могу поделити у две повезане целине. У првој целини, кандидаткиња је показала успешност индукције хипотироидизма метимазолом даваном 7 (M7), 15 (M15) или 21 (M21) дан кроз пијаћу воду, мерењем нивоа тироидних (T3 и T4) и TSH у серуму као и релативног приноса телесне масе животиња. Затим су приказани резултати мерења биохемијских параметара у плазми животиња, концентрације

укупног холестерола, HDL, LDL и триглицерида, глукозе, лактата, урее и креатинина као и амилазе и калцијума који су указали на измењену липидну и глукозну хомеостазу.

Системски снижени нивои хормона и промена биохемијских параметара праћени су ремоделирањем мрког масног ткива што је показано на нивоу ултраструктуре, иако није дошло до промене његове релативне масе. Морфометријска и стереолошка анализа мрких адипоцита показале су ремоделирање органела, прогресивну, временски зависну пролиферацију пероксизома у хипотироидизму, пролазно повећање броја митохондрија у групи M15 као и промену у броју липидних тела. Не само да је број органела промењен већ и њихова позиција у мрким адипоцитима уз међусобно структурно удруживање. Осим биогенезе органела кандидаткиња је показала и анализом броја лизозома (који су постајали бројнији у експерименталним групама) да је запажено ремоделирање ткива резултат и биогенезе и уклањања органела.

С обзиром да је најмаркантија промена у хипотироидизму пролиферација пероксизома показана специфичним бојењем диаминобензидином (DAB), приступило се идентификацији структура у мрким адипоцитима обележавањем каталазе имуноголдом. Резултати су показали да постоји подударност цитохемијског DAB бојења и позитивности на каталазу, а двојно позитивне структуре су затим пребројане и показана је њихова заступљеност у мрким адипоцитима.

Да би се сагледала промена пероксизомалне популације и на молекулском нивоу анализирана је протеинска експресија главних молекулских играча биогенезе и сазревања пероксизома. Анализом деобне машинерије заједничке за митохондрије и пероксизома, VDAC1– молекулског играча који они деле и ремоделирања глатког ендоплазмског ретикулума кандидаткиња је поставила путеве пероксизомалне биогенезе. Показано је да пероксизоми у мрким адипоцитима настају и канонским путем, од већ постојећих органела растом и деобом и *de novo*: пупљењем само са глатког ендоплазмског ретикулума, само са спољашње мембране митохондрија и хибридно – комбинацијом пупљења са глатког ендоплазмског ретикулума и са митохондрија. Сваки од путева биогенезе заступљен је у еутироидној контроли и интензивирањем током хипотироидизма на временски зависан начин и карактерише се специфичним профилима органела и сетовима пероксина.

Хипотироидизам повећава број пероксизома за 1.8, 3.6 и 5.8 пута 7, 15. и 21. дана третмана. Присуство пероксизома, њихова дистрибуција и степен сазревања су хетерогени у мрким адипоцитима на Харлекину-сличан начин, што одражава разлике у њиховом настанку. Да би се открили главни молекулски играчи који покрећу пероксизомалну биогенезу, анализирана је експресија протеина пероксина (Pex) и мембранског транспортера PMP70, укључених у деобу пероксизома (Pex11 β), *de novo* биогенезу пероксизома (Pex16 и Pex19) и структурно/функцијско сазревање пероксизома (Pex16, Pex19, PMP70, Pex5, Pex13, Pex26, Pex6). Резултати анализе су показали да је канонски пут биогенезе, одликован бројним структурама налик на тегове и ниске бисера, подржан високим нивоима Pex11 β и Drp1, превладао 7. дана хипотироидизма. Поред тога, *de novo*

путеви пероксизомалне биогенезе интензивирали су се 15. дана и постали доминантни 21. дана хипотироидизма. Преусмеравање биогенезе пероксизома са канонског на *de novo* пут условљено је показаном повишеном експресијом Pex19, PMP70, Pex5S, Pex26, а карактерише се бројним тубуларним структурама. Неочекивано, протеинска експресија Pex16 и Pex6 је била снижена од 7. дана до краја третмана. Митохондријско порекло пероксизома није афектовано хипотироидизмом и одржава се на нивоу еутироидне контроле. У овој докторској дисертацији показано је да се пролиферација пероксизома у хипотироидизму одвијала у два корака. Први корак, канонским путем се одвијао 7. дана, као брз одговор на измењени статус тироидних хормона, а други корак, *de novo* путем, 21. дана, ради успостављања и одржавања нове метаболичке хомеостазе. Интересантно је да је 15. дана дошло до преклапања ова два пута. Будући да су експресија пероксина и пролиферација пероксизома под транскрипцијом контролом рецептора активираних пролифераторима пероксизома (енг. PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor), анализирана је експресија протеина PPAR α и PPAR γ , као и коактиватора 1 α (енг. PGC-1 α , PPAR γ co-activator 1 alpha).

Осим структуре анализирана је и функцијска оспособљеност пероксизома имунолокализовањем и колокализовањем две изоформе пероксизомалне оксидазе ACOX (енг. ACOX, acyl-CoA oxidase), ACOX1 и ACOX3.

Још један аспект повезаности пероксизома и митохондрија у мрким адипоцитима огледа се и у продукцији слободних радикала као нуспродуката метаболичких путева који се у њима одвијају, нарочито током β -оксидације масних киселина. Међутим, ефекти хипотироидизма на редокс и метаболичку хомеостазу BAT (енг. BAT, brown adipose tissue) такође нису довољно расветљени. Да би се истражила динамика експресије протеина, активност и локализација ензима антиоксидативне одбране AD (енг. AD, antioxidative defense) у BAT пацова, примењена је western blott анализа, анализа ензимске активности, као и два метода визуализације ензима AD – имунофлуоресцентно и имуноголд обележавање. Резултати су показали повишену протеинску експресију CuZn- и Mn-супероксид дисмутазе, каталазе, глутамил–цистеин лигазе, тиоредоксина, укупан садржај глутатиона и активност каталазе и тиоредоксин редуктазе код хипотироидних пацова, у поређењу са еутироидном контролом. Истовремено са порастом AD, откривена је и новоуспостављена нуклеусна, митохондријска и пероксизомална локализација ензима AD. Показано је да хипотироидизам такође индукује асоцијацију митохондрија, пероксизома и липидних тела (MPLB), који креирају специфичне структурно-функцијске јединице. Шта више, хипотироидизам индукује и пораст протеинске експресије и нуклеусну транслокацију главног регулатора редокс-метаболичке хомеостазе, Nrf2 (енг. Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2), као и повећање садржаја 4-хидроксиноненал (енг. 4-HNE, 4-hydroxynonenal) протеинских адукта. Добијени резултати указују на то да је временски и просторно преклапање у ремоделирању AD оркестрирано од стране Nrf2, имплицирајући улогу 4-HNE у овом процесу и сугеришући потенцијални механизам редокс-структурног ремоделирања током адаптације BAT на хипотироидизам. Гледано све заједно, добијени

результати – индукована пролиферација пероксизома и митохондрија, интензивна липолиза, пораст AD и формирање MPLB јединица, указују на хипотироидизмом индуковану термогену активацију BAT.

У поглављу **Дискусија**, подељеном на 7 потпоглавља, изнето је тумачење добијених експерименталних резултата, критичка анализа као и њихово поређење са подацима из литературе.

У поглављу **Закључци** сумирани су најважнији закључци који су произашли из експеримента и резултата анализе биогенезе пероксизома и органела укључених у њихову биогенезу, као и редокс зависног структурног ремоделирања мрког масног ткива у условима измењеног метаболизма у хипотироидизму. Хипотироидизам индукује пролиферацију пероксизома у мрким адипоцитима интензивирајући различите путеве њихове биогенезе на временски зависан начин. Показано је да пероксизоми настају од постојећих органела по моделу раста и деобе, пупљењем од глЕР, од глЕР и митохондрија истовремено – хибридна природа биогенезе пероксизома, и по први пут показано, пупљењем са спољашње мембране митохондрија. Сваки од описаних путева биогенезе пероксизома је присутан у еутироидној контроли и током хипотироидизма и карактерише се специфичним профилима органела и сетом пероксида. Присуство пероксизома, њихова дистрибуција, степен зрелости, али и функција коју обављају су изузетно хетерогени у мрким адипоцитима. Та хетерогеност, харлекинизам, је заправо рефлексација разлика у њиховом настанку.

У контексту регулације биогенезе пероксизома показано је да оркестрирана и заједничка активност PPAR α и PPAR γ , уз учешће PGC-1 α вероватно није једини/неопходни механизам модулације експресије главних молекулских играча који леже у основи биогенезе пероксизома. Показан је паралелни пораст имуноекспресије обе изоформе тироидног рецептора TR α до петнаестог дана третмана, као и појачавање Харлекин ефекта са дужином третмана што указује на високо регулисану активност тироидних хормона у мрком масном ткиву у условима хипотироидизма. У прилог овој тврдњи иде и стабилна експресија дејодиназе 2 у хипотироидизму. Поред тога, по први пут је показана локализација обе изоформе тироидних рецептора у митохондријама мрких адипоцита, чиме се истиче директан утицај тироидних хормона на пролиферацију, диференцијацију, матурацију и функцију митохондрија. Дакле, показана пролиферација пероксизома и митохондрија као и интензивна липолиза у мрким адипоцитима указују на термогену активацију мрког масног ткива индуковану хипотироидизмом.

С обзиром да су пероксизоми уз митохондрије места највеће продукције реактивних врста кисеоника и азота, показано је да хипотироидизам индукује обимно редокс и структурно ремоделирање мрког масног ткива. Индукција антиоксидативне одбране праћена субћелијском релокализацијом ензима антиоксидативне одбране уско је везана за структурну реорганизацију и ремоделирање органела. То ремоделирање подразумева успостављање блиске структурне асоцијације митохондрија, пероксизома и

липидних тела – MPLB јединице и рефлектује потребу за функцијском међуорганеларном кооперацијом и одржањем редокс хомеостазе у мрким адипоцитима. Додатно је показано да хипотироидизам индукује пораст протеинске експресије и активности Nrf2, што указује на његову потенцијалну улогу редокс-сензитивног транскрипционог фактора у редокс-структурном ремоделирању мрког масног ткива, што вероватно укључује и секундарне гласнике редокс зависног сигналног пута, попут 4-HNE.

Литература садржи 360 библиографских јединица. Библиографске јединице су одговарајуће цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Aleksic M**, Kalezic A, Saso L, Jankovic A, Korac B, Korac A. The unity of redox and structural remodeling of brown adipose tissue in hypothyroidism. *Antioxidants* (Basel). 2021 Apr 12;10(4):591. **IF₂₀₂₀= 6,312**
M21a
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8068806/pdf/antioxidants-10-00591.pdf>
2. **Aleksic M**, Golic I, Kalezic A, Jankovic A, Korac B, Korac A. Hypothyroidism intensifies both canonic and the de novo pathway of peroxisomal biogenesis in rat brown adipocytes in a time-dependent manner. *Cells*. 2021, 10(9), 2248. **IF₂₀₂₀= 6,6**
M21
<https://www.mdpi.com/2073-4409/10/9/2248/html>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Aleksic M**, Kalezic A, Korac B, Jankovic A, Korac A. *Peroxisomal cooperation with mitochondria and lipid bodies in brown adipocytes of hypothyroid rats*. Microscopy Conference MC2021, Vienna, Austria, Aug 22-26, 2021. LS2.P015, pp. 347.
2. **Aleksic M**, Lazarevic A, Bogdanovic M, Korac A. *Brown adipocytes mitochondria-peroxisomes crosstalk through catalase and MnSOD redistribution in hypothyroidism*. 4th International Congress SSMFRP – CHALLENGES IN REDOX BIOLOGY, Belgrade, Serbia, Sep 28-30, 2018. PO – P60, pp. 106.
3. **Aleksic M**, Golic I, Markelic M, Jankovic A, Masovic S, Korac B, Korac A. *Hypothyroidism remodels mitochondrial population in rat brown adipocytes: ultrastructural & stereological study*. 13th Multinational Congress on Microscopy, Rovinj, Croatia, Sep 24-29, 2017. PO – PL2-5, pp. 235.
4. **Aleksic M**, Golic I, Cvoro A, Jankovic A, Korac B, Korac A. *Different expression of TRs in rat brown adipose tissue in induced hypothyroidism*. FEBS Advanced lecture course ALC17-012, Nuclear receptors and epigenomic mechanisms in human disease and aging, Spetses, Greece, Aug 27 – Sep 1, 2017. PO-1, pp. 50.
5. **Aleksic M**, Golic I, Korac A, Korac B. *Thyroid hormones regulate mitochondria-peroxisomes crosstalk in rat brown adipocytes*. 3rd Congress SSMFRP – REDOX MEDICINE, Belgrade, Serbia, Sep 25-26, 2015. pp. 61.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње **Марије Н. Алексић**, под насловом „**Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму индукованом метимазолом**” представља оригинални научни рад. Током израде и писања докторске дисертације кандидаткиња је показала висок степен способности за самостални научно-истраживачки рад, постављање јасних циљева и њихову реализацију, критичко разматрање добијених резултата и доношење адекватних закључака. Резултати ове докторске дисертације по први пут показују и расветљавају путеве биогенезе пероксизома у мрким адипоцитим на молекулском и ћелијском нивоу доприносећи бољем разумевању њихове структуре и функције. Посебно желимо да истакнемо резултате који показују редокс посредовано међуорганеларно удруживање у ремоделирању ћелија.

Резултати проистекли из ове докторске дисертације су публиковани у два међународна часописа и презентовани на пет међународних конгреса.

Стога Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Марије Н. Алексић**, под насловом „**Биогенеза пероксизома мрког масног ткива пацова у хипотироидизму индукованом метимазолом**” и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 10.09.2021. године

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

Др Александра Јанковић, научни саветник,
Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша
Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Бато Кораћ, ванредни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет
и
научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања
„Синиша Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију