

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 07.03.2022. године, на основу молбе ментора, др Данијеле Савић, вишег научног сарадника Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, и др Данијеле Лакете, ванредног професора Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милоша А. Опачића**, истраживача сарадника Универзитета у Београду – Института за мултидисциплинарна истраживања, под насловом: **„Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека”**, у саставу: др Сања Дацић, доцент Универзитета у Београду – Биолошког факултета, др Александар Ристић, доцент Универзитета у Београду – Медицинског факултета и др Иван Спасојевић, научни саветник Универзитета у Београду – Института за мултидисциплинарна истраживања.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Милоша А. Опачића под насловом „Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека” урађена је на Одсеку за науку о живим системима Универзитета у Београду – Института за мултидисциплинарна истраживања, уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, институционалног пројекта под евиденционим бр. 451-03-9/2021-14/200053 (на коме је кандидат истраживач сарадник), институционалног пројекта под евиденционим бр. 451-03-9/2021-14/200007 и пројекта билатералне сарадње Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије са Републиком Словенијом под евиденционим бр. 06-00-118/2018-09/22.

Докторска дисертација садржи 98 страна. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (29 страна), Циљеви (2 стране), Материјал и методе (18 страна), Резултати (22 стране), Дискусија (8 страна), Закључци (3 стране), Литература (13 страна, 220 библиографских јединица) и Прилози (3 стране). Дисертација садржи 35 слика (15 у поглављу Увод, 17 у поглављу Резултати, 1 у поглављу Дискусија, и 2 у поглављу Прилози) и 15 табела (2 у поглављу Увод, 10 у поглављу Материјал и методе, и 3 у поглављу Резултати). Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагинирани) елементе са неопходним информацијама о

докторској дисертацији: Насловну страницу на језику на којем је рад писан (српски језик), Насловну страницу на енглеском језику, Страницу са информацијама о менторима, члановима комисије за одбрану докторске дисертације, датумом одбране, Страницу са информацијама о финансирању, Изјаве захвалности, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику, Листу скраћеница и Садржај. На крају дисертације су приложени следећи елементи: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Уводно поглавље докторске дисертације кандидата је подељено у четири целине и бави се прегледом научне литературе која се тиче проблематике докторске дисертације. У фокусу прве целине су епилепсије и епилептични напади као врсте неуролошких поремећаја код људи. Посебно је детаљан осврт на етиопатогенезу и третман епилепсије темпоралног режња спрегнуте са хипокампусном склерозом код човека (мТЛЕ-ХС). У другој целини кандидат даје детаљан преглед анатомије хипокампуса, а посебна пажња је посвећена хипокампусној склерози и карактеристикама њених подтипова. Будући да се ова докторска дисертација бави метаболизмом метала у мТЛЕ-ХС, трећа целина уводног поглавља је посвећена улози и значају бакра, гвожђа, цинка и мангана у мозгу. Посебна пажња је посвећена детаљном прегледу метаболизма бакра, хомеостази овог метала у цитоплазми и митохондријама, особеностима транспортера и шаперона за овај метал, као и његовој кофакторској улози у једном од најзаступљенијих купроензима, цитохром ц оксидази (СОХ). На крају, дат је концизан осврт на поремећаје у хомеостази бакра у нервном систему. Како је кандидат у овој дисертацији користио сложену аналитичку методологију у испитивању садржаја метала у узорцима ткива, у четвртој, последњој целини дат је детаљан преглед литературе на пољу осликавања метала у биолошким системима са фокусом на ласерску аблацију спрегнуту са индуктивно куплованом плазмом и масеном спектрометријом. Уводно поглавље је закључено прегледом полазних основа за испитивање бакра у овом неуролошком поремећају.

У следећем поглављу, јасно и концизно је дефинисано пет научних **циљева** како би се открио узрок смањеног нивоа бакра у склеротичном хипокампусу пацијената оболелих од мТЛЕ-ХС:

1. Испитати хистолошку дистрибуцију и квантитативне промене у количини бакра у регионима и слојевима склеротичних хипокампуса пацијената са мТЛЕ-ХС са израженим (ХС1) и локализованим нивоом склерозе (ХС2).
2. Испитати везу између дистрибуције бакра и густине неурона у региону склеротичног хипокампуса који је најосетљивији на склерозу (СА1) и региону који је резистентан на склерозу и глиозу (СУБ, lat. *subiculum*).
3. Истовремено са бакром испитати хистолошку дистрибуцију гвожђа, цинка и мангана и утврдити како уочене промене у концентрацијама ових метала на

анатомском нивоу региона и слојева одговарају забележеним променама у читавом склеротичном хипокампусу.

4. Испитати квантитативне промене у протеинском нивоу чланова транспортне машинерије за унос бакра у ћелију (SLC31A1), његову доставу до ћелијских органела (АТОХ1 за Голџијев апарат и СОХ17 за митохондрије) и шаперона за уметање у СОХ ензимски комплекс (СОХ17 и СОХ11) у склеротичним хипокампусима пацијената са мТЛЕ-ХС и одговарајућим контролним узорцима.
5. Корелисати густину пирамидалних неурона, дистрибуцију бакра и активност СОХ ензимског комплекса у регионима и слојевима склеротичних хипокампуса пацијената са мТЛЕ-ХС и одговарајућим контролним узорцима.

У поглављу под називом **Материјал и методе** кандидат темељно даје опис свих протокола, хемијских реагенса и истраживачких метода коришћених у овој докторској дисертацији као и преглед употребљених узорака ткива хипокампуса. Кандидат је применио значајан број аналитичких, хистолошких, хистохемијских, биохемијских и молекуларно-биолошких метода, као и метода светлосне микроскопије и денситометријске анализе. Квантитативна анализа потпомогнута је одговарајућим статистичким тестирањем валидности хипотезе. У почетном делу дат је преглед свих коришћених реагенса, антитета, и раствора. Затим су дате неопходне информације о испитаницима и прикупљању узорака. У наставку, кандидат је дао детаљан преглед поступка добијања смрзнутих и парафинских пресека испитиваног ткива. Затим су детаљно описане три хистохемијске методе: а) Нислово бојење за детекцију неуронских ћелија; б) ензимски хистохемијски есеј за одређивање регионалне активности цитохром ц оксидазе; и в) метода имунохистохемијског обележавања протеина у ткиву. Поред тога, детаљно је описан поступак био-осликавања елемената уз помоћ ласерске аблације уз индуктивно спрегнуту плазму и масену спектрометрију и добијања мапа метала у ткиву. Затим су темељно описани и протоколи *in situ* хибридизације са радиоактивним обележавањем олигонуклеотида и ауторадиографским анализама. Описани су сви поступци у анализи слика и микрографија као и денситометријске анализе. Кандидат је детаљно описао и поступке изолације протеинског садржаја ткива хипокампуса као и његову анализу методом имуноблота.

У оквиру поглавља **Резултати**, кандидат је изнео резултате своје докторске дисертације на прегледан и концизан начин у оквиру три тематске целине. Резултати су илустровани и кроз одговарајуће графичке и табеларне презентације, као и у виду композитних слика. У првој целини представљени су резултати хистолошког испитивања склеротичних хипокампуса, као и резултати квантитативног просторног одређивања концентрације метала у овом ткиву, које је показало висок ниво организације у дистрибуцији гвожђа, цинка, мангана и бакра. Додатно је показано да постоји корелациона веза интензитета неуродегенерације и расподеле бакра и мангана, као и да постоји значајно смањење концентрације бакра у регионима потпуне склерозе хипокампусног ткива у пољу СА1. У другој тематској целини поглавља Резултати, кандидат је указао на проблеме у метаболизму бакра. Показано је да постоје промене у

мембранском, унутарћелијском и митохондријском транспорту бакра, односно промене у нивоу мембранског транспортера за бакар као и цитоплазматских и митохондријских шаперона. Применом имуноблот методе указано је на разлике у експресији транспортера SLC31A1 које су повезане са типом склерозе хипокампуса, као и на општи дефицит иРНК митохондријских шаперона за доставу бакра до металоензима цитохром ц оксидазе, али и на смањење активности овог ензима, применом метода *in situ* хибридизације и ензимске хистохемије. Приказани резултати имунохистохемијског испитивања локализације SLC31A1 указују на доминантну експресију у неуронским ћелијама и на карактеристичне мале и ограничене тачкасте депозите. У последњој тематској целини поглавља Резултати спроведена је упоредна анализа образаца неуродегенерације и регионалне расподеле концентрације бакра као и активности цитохром ц оксидазе, помоћу које је кандидат указао на везу ова три параметра. Упоредно испитивање концентрације бакра и густине пирамидалних неурона указало је на пад концентрације бакра у слојевима СП2 и СП3 (пирамидални слојеви СА1 и СА2 региона) склеротичних хипокампуса у односу на контролну групу иако није било значајне разлике у густини пирамидалних неурона и активности цитохром ц оксидазе између обе испитиване групе узорака, у овим слојевима. Кандидат је ензимском хистохемијом спровео детаљну анализу ћелијске и ткивне регионалне активности цитохром ц оксидазе у пољима хипокампуса и додатно показао да је реакциони продукт активности цитохром ц оксидазе био највише смештен у ћелијским телима пирамидалних неурона као и у молекуларном слоју зубате вијуге који садржи дендрите грануларних неурона и синапсе са комисуралним и септалним влакнима и влакнима перфорантног пута. Ензимско-хистохемијски есеј за испитивање регионалне активности цитохром ц оксидазе је показао да се СА4 регион у склеротичним хипокампусима карактерише израженим губитком неурона и појавом крупних неурона са неколико пута већом сомом у поређењу са контролним ћелијама. Коначно, кандидат је дао упоредни хистограмски приказ који сугерише на значајну повезаност густине неурона, концентрације бакра и активности цитохром ц оксидазе код склеротичних хипокампуса. Хистограмска запажања кандидат је и потврдио корелационим анализама. Значајна корелација уочена је између густине неурона и активности ензима и код контролних (умерена позитивна корелација) и склеротичних хипокампуса (умерено висока позитивна корелација). Додатно су код склеротичних хипокампуса установљене и умерено висока позитивна корелација између концентрације бакра и активности ензима, и позитивна корелација умереног нивоа између концентрације бакра и густине неуронских тела.

Кандидат је дао критички осврт и анализу резултата своје докторске дисертације у оквиру поглавља **Дискусија**, ослањајући се на литературне податаке. Резултате је сажео концизно и на једној слици приказао главне промене у компонентама промета бакра. Кандидат је темељно обрадио и дискутовао све добијене резултате, изнео њихово тумачење у контексту постојећих научних сазнања и указао на патофизиолошки значај добијених резултата за настанак, развој и потенцијалну превенцију хумане мГЛЕ-ХС.

У поглављу **Закључци** кандидат је дао 10 концизних закључака произашлих из анализе резултата његове докторске дисертације, груписаних у три тематске целине и један општи закључак:

А) Закључци у погледу расподеле и концентрације метала у хипокампусу:

1. Хистолошка дистрибуција бакра у склеротичним хипокампусима пацијената са мТЛЕ-ХС у оба типа ХС показује висок ниво просторне организације овог метала која је у тесној вези са распоредом региона, субрегиона и слојева хипокампуса. Бакар се налази у вишим концентрацијама у регионима који доминантно садрже тела неурона, а нижим у регионима неуропила. Бакар се у највећој мери налази у СУБ, очуваном региону (са телима пирамидалних неурона) у оба типа ХС, у односу на остале регионе хипокампуса који показују ниже концентрације овог метала.
2. Концентрације бакра се налазе у значајној, позитивној корелацији са густином тела пирамидалних неурона у СА1 пољу као региону склеротичног хипокампуса који је најосетљивији на склерозу код мТЛЕ пацијената. Додатно, у подобласти потпуног губитка неурона у СП1, уочене су значајно мање концентрације бакра у односу на СУБ, регион који је резистентан на губитак неурона, у оба типа ХС, што није био случај са гвожђем, цинком и манганом.
3. Разлике у концентрацијама гвожђа и цинка на анатомском нивоу региона и слојева одговарају нормалним физиолошким особеностима одговарајућих делова хипокампуса. Веће концентрације гвожђа су забележене у областима кроз које пролазе главни путеви крвних судова, док су повећане концентрације цинка уочене у зонама проласка маховинастих влакана грануларних цинк-глутаматских неурона. Концентрације мангана показују позитивну корелацију са густином пирамидалних неурона тј. степеном склерозе хипокампуса.

Б) Закључци у погледу компоненти које учествују у ћелијском и митохондријском промету бакра:

4. Укупни релативни ниво кључног транспортера за унос бакра у ћелије, SLC31A1 зависан је од типа ХС и показује двојак промене: повећан је у интензивној склерози (ХС1) а смањен у локализованој склерози (ХС2). SLC31A1 је у склеротичним хипокампусима локализован доминантно у неуронима, како у активној форми на ћелијској мембрани тако и у интернализованој форми у цитоплазми.
5. Укупни релативни ниво АТОХ1 шаперона је непромењен у оба типа ХС у односу на контролне узорке.
6. Експресија шаперонских протеина за уметање бакра у СОХ ензимски комплекс (СОХ11 и СОХ17) била је значајно смањена у хипокампусним регионима који су у епилепсији осетљиви на склерозу у односу на физиолошке услове.

Ц) Закључци на основу упоредне анализе активности СОХ и концентрације бакра у различитим слојевима ХС и контролних хипокампуса:

7. Ензимски комплекс СОХ на ћелијском нивоу показује локалну расподелу активности која је најизраженија у телима и дендритима пирамидалних неурона. Смањена активност овог ензима се детектује у СП1 и СА4, хипокампусним регионима који су највише погођени склерозом.
8. У СП2 и СП3, регионима који су у ХС мање осетљиви на склерозу па самим тим имају очувану популацију неурона, није забележен пад активности СОХ, док је концентрација бакра била значајно мања у односу на контролне узорке.
9. Постоји значајна позитивна корелација између концентрације бакра и активности СОХ у ХС.
10. Корелационе анализе бројности неурона, расподеле бакра и расподеле активности СОХ у регионима пирамидалних неурона мТЛЕ-ХС1 хипокампуса и одговарајућим контролним узорцима јасно сугеришу повезаност ова три параметра.

На основу наведених појединачних закључака, кандидат је извео општи закључак да хумани склеротични хипокампус код пацијената који болују од мТЛЕ показује карактеристичне обрасце расподеле концентрација бакра, као и гвожђа, цинка и мангана у односу на своје анатомске регионе, поља и слојеве. Поред тога, у хуманој мТЛЕ-ХС долази до промена у локалним концентрацијама бакра у слојевима и регионима склеротичног хипокампуса, за шта се одговорност не може приписати искључиво патолошкој реорганизацији главних ћелијских популација (пирамидалних неурона СА региона и грануларних неурона зубате вијуге), већ су те промене у концентрацијама бакра вероватно активни учесник у развоју хиперексцитабилности и конвулзија као и хистопатолошка компонента у развоју склерозе. Уочене промене на нивоу бакра код хуманог склеротичног хипокампуса су у складу са уоченим променама на нивоу ћелијских транспортних путева овог метала, пре свега SLC31A1 као мембранског транспортера за унос бакра у цитосол. Додатно, измењена хомеостаза бакра, у спрези са променама у митохондријском метаболизму овог метала на нивоу биогенезе и активности ензимског комплекса цитохром ц оксидазе, такође може имати улогу у развоју и прогресији мТЛЕ-ХС. Имајући све поменуто у виду, истраживања у склопу ове дисертације дају веома важне податке о улози бакра код хипокампусне склерозе. Начињен је и корак напред у тумачењу резултата добијених са металних мапа бакра из склеротичног хипокампуса. У перспективи, добијени резултати могу бити од користи за развој нових терапијских приступа у лечењу епилепсије темпоралног режња као и развоја профилаксе за спречавање настанка отпорности на постојеће лекове, како би се одгодио или у потпуности избегао оперативни приступ.

У поглављу **Литература** на прегледан начин је приказано 220 библиографских јединица које су на адекватан начин цитиране при писању дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Opačić M, Ristić AJ, Savić D, Šelih VS, Živin M, Sokić D, Raičević S, Baščarević V, Spasojević I. (2017) Metal maps of sclerotic hippocampi of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Metallomics*. 9(2):141–148, **M21** (Biochemistry and Molecular Biology 70/293), IF₂₀₁₇ = 4.069, <https://doi.org/10.1039/c6mt00293e>
2. Opačić M, Ristić AJ, Sokić D, Baščarević V, Raičević S, Savić S, Zorović M, Živin M, Šelih VS, Spasojević I, Savić D. (2021) Regional distribution of cytochrome c oxidase activity and copper in sclerotic hippocampi of epilepsy patients. *Brain Behav*. 11:e01986, **M23** (Neurosciences 197/273), IF₂₀₂₀ = 2.708, <https://doi.org/10.1002/brb3.1986>

B2. Kongresna saopšteња na skupovima međunarodnog značaja

1. Opačić M, Zorović M, Savić D, Živin M, Raičević S, Baščarević V, Ristić A, Sokić D, Spasojević I. (2018) Cytochrome C oxidase activity and the expression of related copper chaperones in sclerotic hippocampi of mTLE patients. FEBS3+ conference: “From molecules to Living Systems”. Siófok, Hungary, 2–5. Sep, 2018. Book of abstracts: 189, **M34**
2. Opačić M, Zorović M, Savić D, Živin M, Raičević S, Baščarević V, Ristić A, Sokić D, Spasojević I. Relationship between regional distributions of cytochrome C oxidase and copper-delivering chaperones in sclerotic hippocampi of epilepsy patients. FENS Regional Meeting 2019. Belgrade, Serbia, 10–13. Jul, 2019. Book of abstracts: 296, **M34**
3. Savić D, Opačić M, Nestorov J, J. Ristić AJ, Sokić D, Baščarević V, Raičević S, Savić S, Zorović M, Živin M, Šelih VS, Spasić S, Spasojević I. The importance of copper in pathology of mesial temporal lobe epilepsy. FENS Regional Meeting 2019. Belgrade, Serbia, 10–13. Jul, 2019. Book of abstracts: 46, **M32**

B3. Kongresna saopšteња na skupovima domaћeg značaja

1. Opačić M, Ristić AJ, Savić D, Šelih VS, Živin M, Sokić D, Raičević S, Baščarević V, Spasojević I. Imaging and regional distribution of copper, zinc, manganese and iron in sclerotic hippocampi of patients with mesial temporal lobe epilepsy. 7th Conference of Serbian Biochemical Society: “Biochemistry of Control in Life and Technology”. Faculty of Chemistry, Serbian Biochemical Society. Belgrade, Serbia, 10–10. Nov, 2017. Proceedings: 179–181, **M63**
2. Opačić M, Nestorov J, Tasić D, Bogdanović Pristov J, Savić D, Baščarević V, Ristić A, Sokić D, Spasojević I. Odabir endogene kontrole za imunoblot analizu proteina u sklerotičnim hipokampusima pacijenata sa epilepsijom temporalnog režnja. Drugi kongres biologa Srbije, Srpsko biološko društvo. Kladovo, Srbija, 25–30. Sep, 2018. Knjiga sažetaka: 164, **M64**
3. Savić D, Opačić M, Ristić AJ, Sokić D, Baščarević V, Raičević S, Savić S, Živin M, Šelih VS, Spasić S, Spasojević I. Distribution and role of metals in sclerotic hippocampi of patients with mesial temporal lobe epilepsy. 8th Conference of Serbian Biochemical Society: “Coordination in Biochemistry and Life”. Faculty of Chemistry, Serbian Biochemical Society. Novi Sad, Serbia, 16–16. Nov, 2018. Proceedings: 105–112, **M61**

4. Опаčić M, Brkljačić J, Raičević S, Savić S Ristić A, Baščarević V, Sokić D, Spasojević I, Savić D. Distribution of high-affinity copper transporter CTR1 in sclerotic hippocampi of mTLE patients. 10th Conference of Serbian Biochemical Society: “Biochemical Insights into Molecular Mechanisms”. Faculty of Chemistry, Serbian Biochemical Society. Kragujevac, Serbia, 24–24. Sep, 2021. Proceedings: 57–58, M64

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Милоша А. Опачића, бр. индекса Б3032/2015, послата је дана 22.02.2022. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 22.02.2022 (у даљем тексту: Извештај).

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (у даљем тексту: Правилник) и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека“, аутора Милоша А. Опачића, ментор је констатовао да утврђено подударање текста износи 7%. Овај степен подударности последица је приложених образаца, личних имена, назива, цитата, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Када се све изнето узме у обзир, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Милоша А. Опачића, под насловом „Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију Милоша А. Опачића, као и у научне публикације проистекле из резултата ове докторске дисертације, Комисија закључује да ова докторска дисертација представља оригинални научни допринос у области металомике хуманог хипокампуса и разумевања улоге метала у патологији епилепсије темпоралног режња спрегнуте са хипокампусном склерозом код човека. Резултати ове докторске дисертације откривају висок ниво хистолошке организације бакра и дају важне податке о променама у метаболизму овог метала у хипокампусној склерози на ћелијском и митохондријском нивоу. Поред тога, овим резултатима се указује да измењена хомеостаза бакра може имати улогу у развоју хиперексцитабилности и конвулзија. Према томе, приказани резултати имају широк значај и могу бити од користи за унапређење постојећих терапеутских стратегија лечења овог неуролошког поремећаја.

Имајући у виду значај и могући утицај ове истраживачке проблематике у хуманој медицини, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију под насловом **„Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека“**, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета да овај извештај прихвати и одобри **Милошу А. Опачићу** јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 08.03.2022. године

др Сања Дацић, доцент,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Александар Ристић, доцент,
Универзитет у Београду – Медицински факултет

др Иван Спасојевић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за мултидисциплинарна истраживања