

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 09.09.2022. године, на основу молбе ментора, др Ане Ђорђевић, 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 Љупке Н. Глигоровске, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, под насловом: „Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif^{-/-}* мишева на режиму исхране обogaћене фруктозом“, у саставу: др Горан Брајушковић, редовни професор Универзитета у Београду - Биолошки факултет, др Ђорђе Миљковић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду и др Биљана Бурсаћ, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду.

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 Љупке Н. Глигоровске под насловом „Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif^{-/-}* мишева на режиму исхране обogaћене фруктозом“, написана је на 107 страна и подељена на 8 поглавља: **Увод** (27 страна), **Циљ рада** (1 страна), **Материјал и методе** (11 страна), **Резултати** (24 стране), **Дискусија** (16 страна), **Закључци** (1 страна), **Литература** (22 стране) и **Прилози** (5 страна). Рад садржи 305 литературних цитата, 29 слика и 11 табела. Дисертација садржи и уводне непагиниране стране где се налазе: Захвалница, Списак скраћеница, Садржај и Сажетак на српском и енглеском језику.

Анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод**, кандидаткиња Љупка Н. Глигоровска кроз четири поглавља даје детаљан преглед података из научне литературе, који су непосредно везани за предмет и проблематику докторске дисертације. У првом поглављу под насловом „Исхрана обogaћена фруктозом и метаболички поремећаји“ кандидаткиња нас упознаје са историјским аспектом употребе фруктозе у људској исхрани и специфичностима метаболизма овог шећера у јетри. Посебан акценат стављен је на развој метаболичких поремећаја, попут инсулинске резистенције, гојазности и неалкохолне масне болести јетре, који се могу јавити услед претераног уноса фруктозе. У следећем поглављу под називом „Липидни метаболизам“, детаљно су описани процеси адипогенезе, липогенезе и липолизе у висцералном масном ткиву, као и процеси *de novo* липогенезе и β -оксидације у јетри, са посебним освртом на ензиме и транскрипционе факторе који су укључени у ове процесе. Такође, у оквиру овог поглавља посебан одељак је посвећен прегледу хормона који регулишу липидни метаболизам, као што су инсулин и глукокортикоидни хормони. Поглавље под називом „Глукокортикоидни хормони“ ближе нас упознаје са функцијом глукокортикоидних хормона и молекуларним механизмима њиховог деловања, која остварују преко глукокортикоидног рецептора (ГР). Ово поглавље садржи и детаљан преглед литературе која се односи на пререцепторски метаболизам глукокортикоида, као и на приказ структуре и функције ГР-а. У последњем поглављу под називом „Метаболичка инфламација“ дат је детаљан опис развоја инфламације у масном ткиву услед прекомерног уноса хране, посебно шећера. Посебна пажња је посвећена про-инфламаторном цитокину, фактору инхибиције миграције макрофага (енг. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF), при чему је детаљно описана његова улога у инфламацији, регулацији енергетског метаболизма и метаболичким поремећајима. Такође, кандидаткиња нас ближе упознаје са антагонистичким дејством MIF-а у односу на глукокортикоидне хормоне, као и са физиолошким последицама делеције гена *Mif* код MIF^{-/-} мишева.

У оквиру ове докторске дисертације у којој су праћени ефекти недостатка MIF-а на липидни метаболизам у висцералном масном ткиву и јетри након исхране обogaћене фруктозом, у поглављу **Циљеви** дефинисани су следећи научни циљеви:

1. Биохемијска анализа инсулинске осетљивости и липидног профила у крви, као и карактеризација морфолошких промена у висцералном масном ткиву и јетри MIF^{-/-} мишева након исхране обogaћене фруктозом.
2. Праћење пререцепторског метаболизма глукокортикоидних хормона, као и испитивање концентрације и унутарћелијске прерасподеле ГР-а.
3. Анализа експресије ензима укључених у метаболизам липида у висцералном масном ткиву и јетри који су директно или индиректно регулисани ГР-ом.
4. Испитивање експресије транскрипционих регулатора, који су партнери ГР-а у регулацији липогенезе и адипогенезе у масном ткиву, као и регулатора липогенезе и β-оксидације масних киселина у јетри.
5. Праћење метаболичке инфламације у висцералном масном ткиву и јетри испитивањем експресије про-инфламаторних цитокина.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** наведене су апаратуре и хемикалије које су коришћене у експериментима. Кандидаткиња је детаљно описала експерименталне групе и експерименталне методе, као и начин на који су обрађени и презентовани резултати.

У поглављу **Резултати** дат је детаљан приказ података добијених током израде ове докторске студије који су приказани у 8 табела и илустровани на 16 слика. Приказ резултата који су статистички анализирани може се сумирати на следећи начин:

Полазећи од претпоставке да MIF остварује утицај на липидни метаболизам у масном ткиву и јетри посредством глукокортикоидних хормона у нормалним условима, као и у условима енергетског оптерећења изазваног исхраном обogaћеном фруктозом, анализирани су физиолошки и биохемијски параметри који говоре о метаболичком статусу ових животиња. Резултати су показали да је исхрана обogaћена фруктозом довела до повећања укупног енергетског уноса, при чему је унос хране код ових животиња био смањен, а унос течне фруктозе повећан. Иако исхрана обogaћена фруктозом не доводи до промене укупне телесне масе, комбинација недостатка MIF-а и исхране обogaћене фруктозом узрокује повећање масе висцералног масног ткива, као и односа масе масног ткива и укупне телесне масе. Даљом анализом метаболичког статуса ових животиња, установљено је да недостатак гена *Mif* доводи до хиперлептинемije, хипергликемије,

хиперинсулинемије и системске инсулинске резистенције независно од режима исхране. Иако није било промена у нивоу триглицерида и слободних масних киселина у крви, исхрана богата фруктозом довела је до појаве висцералне гојазности и стеатозе јетре.

Ефекти исхране обогаћене фруктозом у висцералном масном ткиву и јетри мишева, праћени су анализом инфламације и глукокортикоидне сигнализације, као и испитивањем експресије ензима укључених у метаболизам липида, који су директно или индиректно регулисани ГР-ом. Добијени резултати су показали да је код $MIF^{-/-}$ мишева храњених фруктозом присутно повећање концентрације кортикостерона у висцералном масном ткиву, које је било праћено активацијом пререцепторског метаболизма глукокортикоида, као и повишеним нивоом протеина ГР. Такође, код истих животиња примећена је и активација ензима укључених у *де ново* липогенезу, као и повећање нивоа транскрипционих фактора који су укључени у процесе липогенезе и адипогенезе: протеин који се везује за елемент регулисан стеролом 1 (енг. *sterol regulatory element binding protein*, SREBP1c) и рецептор активиран пероксизомалним пролифератором γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ), што заједно са уоченом хипертрофијом адипоцита може да укаже на то да исхрана обогаћена фруктозом доводи до појаве адипогенезе и хипертрофије адипоцита само у одсуству гена *Mif* и у условима појачане глукокортикоидне сигнализације. Такође, у оквиру ових истраживања резултати су показали да недостатак гена *Mif* и исхрана обогаћена фруктозом нису довели до промена у експресији про-инфламаторних цитокина у висцералном масном ткиву.

У наставку ове докторске студије показано је да исхрана обогаћена фруктозом доводи до активације процеса липогенезе и у јетри, при чему су ови ефекти додатно погоршани недостатком гена *Mif*. Наиме, повећани прилив слободних масних киселина из циркулације у јетру посредован протеином CD36 и повећана експресија ензима и транскрипционих фактора (SREBP1c, ChREBP и LXR α/β) укључених у *де ново* липогенезу, као и смањена експресија регулатора β -оксидације масних киселина (CPT1, PPAR α и PGC-1 α), допринели су акумулацији липида уоченој у јетри $MIF^{-/-}$ мишева на исхрани обогаћеној фруктозом. Код $MIF^{-/-}$ животиња забележена је смањена концентрација цитосолног и повећан ниво једарног ГР-а, што указује на транслокацију рецептора и активацију глукокортикоидне сигнализације, која заједно са повећаном експресијом

про-инфламаторних цитокина у јетри посредује у штетним ефектима делеције гена *Mif* и исхране обogaћене фруктозом на промену морфологије и метаболизма липида у јетри.

У оквиру поглавља **Дискусија**, кандидаткиња је интерпретирала и анализирила добијене експерименталне резултате уз критички осврт на литературне податке. У првом делу поглавља, које се односи на биохемијске параметре метаболизма липида и глукозе, дискутован је начин на који недостатак гена *Mif* и исхрана обogaћена фруктозом доводе до повећања концентрације глукозе и инсулина у крви узрокујући развој системске инсулинске резистенције, при чему не утичу на промене липидног профила у крви. У следећем одељку, анализиран је ефекат фруктозне исхране на сигнални пут глукокортикоида и липидни метаболизам у висцералном масном ткиву $MIF^{-/-}$ мишева. На основу добијених резултата, закључено је да су липогенеза и адипогенеза, које се јављају у масном ткиву након исхране обogaћене фруктозом, највероватније последица активације пререцепторског метаболизма глукокортикоида и повећања нивоа ГР-а, али само у одсуству MIF -а. У наставку дискусије, анализиране су промене липидног метаболизма у јетри код $MIF^{-/-}$ мишева у условима калоријског преоптерећења изазваног исхраном обogaћеном фруктозом. Добијени резултати указују на то да активација *de novo* липогенезе и инхибиција β -оксидације у јетри $MIF^{-/-}$ мишева након исхране обogaћене фруктозом настаје као последица појачане инфламације и стимулисане глукокортикоидне сигнализације. У последњем одељку дискусије, кандидаткиња је коментарисала комуникацију између висцералног масног ткива и јетре у регулацији метаболизма липида код $MIF^{-/-}$ мишева након исхране обogaћене фруктозом. Резултати ове докторске дисертације указују на постојање везе између поремећеног метаболизма липида у висцералном масном ткиву и развоја стеатозе јетре, првенствено услед повећања уноса слободних масних киселина у јетру, као и активације хепатичне липогенезе и смањења β -оксидације, што последично доводи до развоја системске инсулинске резистенције код $MIF^{-/-}$ мишева храњених фруктозом.

У поглављу **Закључци**, на основу добијених резултата, кандидаткиња је изнела следеће закључке:

1. Недостатак гена *Mif* и исхрана обogaћена фруктозом доводе до хипергликемије, хиперинсулинемије, поремећаја системске инсулинске осетљивости и

хиперлептинемиије, што није праћено променама у концентрацији слободних масних киселина и триглицерида у крви. Висцерална гојазност и стеатоза јетре код ових животиња су највероватније резултат активације липогених ензима у овим ткивима.

2. Исхрана обогаћена фруктозом код MIF^{-/-} мишева довела је до активације адипогенезе и липогенезе у висцералном масном ткиву, док је у јетри довела до стимулације *de novo* липогенезе и инхибиције β-оксидације масних киселина, услед повећања уноса слободних масних киселина из циркулације.
3. Метаболички ефекти исхране обогаћене фруктозом код MIF^{-/-} мишева највероватније су последица активације пререцепторског метаболизма глукокортикоида и повећања нивоа ГР-а у висцералном масном ткиву и јетри. Ове промене нивоа ГР-а доводе до стимулације експресије ензима и транскрипционих регулатора укључених у липидни метаболизам, који су директно или индиректно регулисани ГР-ом.
4. Исхрана обогаћена фруктозом није узроковала промену експресије цитокина у масном ткиву. У јетри је примећена повећана експресија про-инфламаторних цитокина и појава фокалне и конфлуентне некрозе код MIF^{-/-} животиња, што је највероватније последица појаве микровезикуларних масних промена и липотоксичности услед прилива слободних масних киселина из циркулације.
5. Метаболички стрес изазван конзумирањем фруктозе није довео до појаве балонирајућих дегенерација и фиброзе, али је узроковао активацију регенеративног механизма у јетри.

На основу добијених података, намеће се општи закључак да исхрана обогаћена фруктозом изазива поремећај метаболизма глукозе и липида код MIF^{-/-} мишева услед појачане сигнализације глукокортикоида у условима инсулинске резистенције, као и да MIF има протективну улогу у висцералној гојазности и стеатози јетре.

Поглавље **Литература** садржи листу од 305 библиографских јединица. Референце се односе на истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију, адекватно су цитиране и објашњавају добијене резултате.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Gligorovska Lj**, Bursać B, Kovačević S, Veličković N, Matić G, Djordjevic A. (2018) *Mif* deficiency promotes adiposity in fructose-fed mice. *J Endocrinol*, 240:133-145, **M21** (IF₂₀₁₈ = 4.381), <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0333>
2. **Gligorovska Lj**, Teofilović A, Vojnović Milutinović D, Miladinović N Kovačević S, Veličković N, Djordjevic A. (2021) Macrophage migration inhibitory factor deficiency aggravates effects of fructose-enriched diet on lipid metabolism in the mouse liver. *BioFactors*, 47(3):363-375, **M21** (IF₂₀₂₁ = 6.438), <https://doi.org/10.1002/biof.1711>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Gligorovska Lj**, Bursac B, Djordjevic A, Teofilovic A, Velickovic N, Vojnovic Milutinovic D, Matic G. Glucocorticoid signaling and inflammation in the adipose tissue of macrophage migration inhibitory factor-knockout mice kept on fructose-enriched diet. 2nd Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students, 10-13 February 2016, Belgrade, Serbia, pp 19. **M34**
2. **Gligorovska Lj**, Bursać B, Teofilović A, Veličković N, Vojnović Milutinović D, Kovačević S, Matić G, Djordjevic A. Crosstalk between adipose tissue and liver in the regulation of lipid metabolism in *Mif* deficient mice on fructose diet. EMBO Workshop Organ crosstalk in energy balance and metabolic disease, 08-11. April 2019, Cádiz, Spain, **M34**
3. **Gligorovska Lj**, Teofilović A, Veličković N, Vojnović Milutinović D, Kovačević S, Matić G, Djordjevic A. Effects of *Mif* deficiency and fructose-enriched diet on lipid metabolism in the mouse liver, 27th FAOBMB & 44th MSBMB Conference Young Scientist Program (YSP), 15-18. August 2019, Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 39, **M32**
4. **Gligorovska Lj**, Teofilović A, Veličković N, Vojnović Milutinović D, Kovačević S, Matić G, Djordjevic A. Inflammation and insulin sensitivity in the liver of fructose-fed *Mif* deficient mice. Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, 06-08. December 2019, Belgrade, Serbia, pp. 53, **M34**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Gligorovska Lj**, Djordjevic A, Bursac B, Teofilović A, Veličković N, Vojnović Milutinović D, Kovačević S, Matić G. Glucocorticoid-mediated effects of *Mif* deficiency and fructose-enriched diet on lipid metabolism in the mouse intra-abdominal adipose tissue. First Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS2017), 20-22 September, 2017, Belgrade, Serbia, pp. 38. **M64**
2. **Gligorovska Lj**, Teofilović A, Veličković N, Vojnović Milutinović D, Matić G, Djordjevic A. Glucocorticoid-mediated effects of *Mif* deficiency and fructose-enriched diet on energy metabolism in the mouse liver. IUBMB advanced school Nutrition, Metabolism and Aging, 2018, Belgrade, Serbia, isbn: 978-86-80335-07-0, pp. 17. **M64**

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације кандидаткиње Љупке Глигоровске под називом „Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif*^{-/-} мишева на режиму исхране обогаћене фруктозом“, утврђен је проценат подударности од 22%. Овај степен подударности претежно је последица подударања имена и афилијација ментора и чланова Комисије; имена аутора, наслова радова и других библиографских података о коришћеној литератури; назива гена, протеина, биолошких врста, хемијских једињења; симбола којима се означавају гени и протеини; назива коришћених метода; симбола којима се обележавају статистичке значајности, појединих детаља стандардних експерименталних процедура, као што су састави инкубационих смеша и раствора; делова реченица који сами за себе немају смисао (нпр. „резултати ове докторске дисертације“, „резултати су приказани као средња вредност“, „На основу добијених резултата може се закључити да код“ и сл.); случајне синтагме (нпр. „након исхране“, „обогачена фруктозом“, „висцерално масно ткиво“ и сл.). Када се све изнето узме у обзир, степен подударања је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и извештај указује на оригиналност докторске дисертације.

Мишљење и предлог Комисије

На основу анализе докторске дисертације кандидаткиње Љупке Глигоровске, под насловом „**Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif*^{-/-} мишева на режиму исхране обогаћене фруктозом**“, Комисија закључује да резултати представљају значајан допринос у области и разумевању утицаја про-инфламаторног цитокина MIF-а на липидни метаболизам и развој метаболичких поремаћаја у висцералном масном ткиву и јетри посредством глукокортикоидних хормона након исхране обогаћене фруктозом.

Стога, имајући увид у целокупну истраживачку активност кандидаткиње и значај постигнутих резултата, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати овај извештај и одобри Љупки Н. Глигоровској јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Метаболизам липида и сигнални пут глукокортикоида у висцералном масном ткиву и јетри *Mif*^{-/-} мишева на режиму исхране обогаћене фруктозом**“.

КОМИСИЈА:

У Београду 10.09.2022. године

др Горан Брајушковић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Ђорђе Миљковић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-
Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду

др Биљана Бурсаћ, виши научни сарадник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-
Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду