

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној **15.05.2015.** године, прихваћен је извештај ментора др Александре Кораћ, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Весне Оташевић, вишег научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **Игора Љ. Голића**, истраживача сарадника на Институту за зоологију Биолошког факултета, под насловом **„Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: **др Александра Кораћ**, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Весна Оташевић**, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и **др Бато Кораћ**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Игора Љ. Голића** под насловом **„Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова“** обухвата 143 странице текста, 80 слика и 6 табела. Текст се састоји од 7 поглавља и то: **увод** (21 страна), **циљ рада** (2 стране), **материјал и методи** (16 страна), **резултати** (52 стране), **дискусија** (10 страна), **закључци** (2 стране) и **литература** (40 страна).

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** докторске дисертације Игор Голић прво даје кратко, занимљиво подсећање на историјат открића митохондрија у контексту савремених сазнања о овој јединственој органели, а затим описује мрке адипоците, њихову улогу код сисара, укључујући и човека, и указује на значај митохондрија с обзиром да су мрки адипоцити ћелије са великим бројем митохондрија и да је њихова термогена функција важна за одржање укупног енергетског баланса организма. Нарочиту пажњу кандидат посвећује биоенергетици, истичући митохондрије као централно место метаболичких (катаболичких и анаболичких) путева, регулације ћелијског метаболизма, живота и смрти ћелије, редокс контроле, као и хомеостазе калцијума. Наиме, највећи део АТФ у ћелији се продукује у митохондријама, где се сустичу и одигравају путеви оксидације шећера, масних киселина

и аминокиселина. Зато је и очигледно да је дисфункција митохондрија, односно поремећена биоенергетика у основи бројних болести. Карактерише је енергетски дефицит, тј. смањен капацитет за продукцију АТФ. Промене у оксидативној фосфорилацији, продукција реактивних врста кисеоника (*енгл.* reactive oxygen species, ROS) и митохондријална оштећења заједнички су именитељ инсулинске резистенције, дијабетеса, гојазности и канцера. Познавање молекулских основа ових процеса отвара и могућност интервенисања на нивоу ћелијског, митохондријалног пула и развијање стратегија терапијских интервенција у овим болестима.

Из тог разлога кандидат затим детаљно приказује главне компоненте сисарског система оксидативне фосфорилације у митохондријама, четири комплекса респираторног ланца: NADH:убикинон оксидоредуктазу (комплекс I, NADH дехидрогеназа), сукцинат:убикинон оксидоредуктазу (комплекс II, сукцинат дехидрогеназа), убихинон:цитохром c оксидоредуктазу (комплекс III), цитохром c оксидазу (комплекс IV), као и АТФ синтазу (комплекс V). Проток електрона кроз комплексе респираторног ланца праћен је пумпањем протона из матрикса митохондрија у међумембрански простор и у митохондријама мрких адипоцита користи се како за синтезу АТФ (када се протони враћају у матрикс преко Fo субјединице АТФ синтазе) али и за термогену функцију (када се протони враћају преко UCP1, *енгл.* uncoupling protein 1), а ускладиштена енергија ослобађа се као топлота. Такође, описана је и функција инхибиторног фактора 1 (IF1), као и друга два декуплујућих протеина UCP2 и UCP3.

Даље, у **Уводу** кандидат нас уводи у фину игру структуре и функције на нивоу митохондрија показујући да енергетско стање, метаболичка активност и изглед митохондрија стоје као предмет и лик у огледалу и да се унутрашња архитектура митохондрија прилагођава и/или диктира синтезу АТФ. Ремоделирање мрких адипоцита у условима измењене енергетске хомеостазе праћено је управо ремоделирањем митохондрија. Кандидат нам даје најновије податке о структури респиратома, кључним молекулским компонентама њиховог асамблирања и њиховој улози у формирању ламеларних кристи.

На крају, дати су подаци о улози калцијума и инсулина у биоенергетици мрких адипоцита, као и улози ендоплазног ретикулума у ремоделирању митохондрија.

С обзиром на важност калцијума и инсулина у ремоделирању мрких адипоцита кандидат је поставио као **Циљ истраживања** расветљавање молекулских основа структурног ремоделирања митохондрија индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова. У ту сврху, анализирано је ултраструктурно ремоделирање митохондрија (облик митохондрија, изглед матрикса и кристи), као и динамика ремоделирања митохондрија (фисија и фузија митохондрија, одржање митохондријалне мреже, одржање баланса кључних протеина укључених у митохондријалну динамику). Како постоји нераскидива веза структуре и функције, циљ ове докторске дисертације био је и карактеризација биоенергетског капацитета митохондрија, односно промена протеинске експресије, активности и локализације појединачних комплекса електрон транспортног ланца и АТФ синтазе у директној корелацији са променама митохондријалне структуре.

С обзиром да је неопходно и разумевање на који начин, калцијум, са једне стране, а инсулин са друге стране, утичу на активацију термогенезе, односно повећање термогеног капацитета мрких адипоцита, анализирана је експресија UCP1, UCP2 и UCP3. Такође, да би се стекао увид какав је међуоднос продукције енергије и продукције топлоте, мерена је активност АТФ синтазе.

У оквиру поглавља **Материјал и методи** описани су методи ћелијске и молекуларне биологије коришћени у реализацији постављених циљева. Користила су се два анимална *in vivo* модела у којима су анализирани узорци интерскапуларног депоа мрког масног ткива: а) суплементација калцијумом и б) хиперинсулинемија.

У првом моделу, мужјаци пацова Wistar соја, старости 2 до 3 месеца, подељени су у две групе. Контролна група је била појена чесменском водом, а третирана група водом суплементисаном Ca-SANDOZ® (480 mg/L Ca²⁺). Трећег дана све животиње су жртвоване декапитацијом.

У другом моделу, мужјаци пацова Wistar соја, старости 2 до 3 месеца, били су подељени у укупно шест група, од којих су четири биле третиране инсулином (0.4 IU/kg или 4 IU/kg телесне масе, интраперитонеално) у трајању од једног (акутни третман) или три дана (хронични третман). Преостале две групе, контроле биле су третиране физиолошким раствором на исти начин (интраперитонеалним инјектирањем, акутно или хронично). Три сата након последњег третмана, све животиње жртвоване су декапитацијом. Одмах након жртвовања, интерскапуларни депои мрког масног ткива су изоловани, измерени и одвојени за светлосну, конфокалну и електронску микроскопију, анализу експресије протеина, изолацију митохондрија и за одређивање ензимске активности. Ефекат инсулина, односно калцијума, на енергетски метаболизам био је праћен одређивањем митохондријалног капацитета за оксидативну фосфорилацију (мерањем протеинске експресије појединачних компоненти респираторног ланца и АТФ синтазе). Такође, одређиван је и термогени капацитет мрких адипоцита, праћењем експресије UCP1 и друге две изоформе декуплујућег протеина.

Посебан осврт је био на структурним променама како самих мрких адипоцита, тако и митохондрија мрких адипоцита, променама матрикса и кристи митохондрија. Урађена је електрон-томографска реконструкција митохондрија под деловањем инсулина и колокализација комплекса III и комплекса IV имуноголд методом. Пратила се и интеракција са другим органелама, пре свега глатким ендоплазмним ретикулумом и пероксизомима.

У поглављу **Резултати**, кандидат је систематски и јасно изложио резултате спроведених истраживања. Руководећи се постављеним циљевима резултати су подељени у две целине, у којима су на прегледан и сликовит начин изнети добијени експериментални подаци.

У првом делу поглавља **Резултати**, утврђено је да суплементација калцијумом доводи до уноса калцијума у мрке адипоците и то на два начина: класичним преузимањем преко плазмине мембране али и, по први пут описаним путем, егзовезукулацијом еритроцита у капиларима мрког масног ткива. Ослобођени егзозоми уносе се у мрке адипоците носећи хемихромне порозне комплексе који се ситуирају у цитоплазми и

митохондријама мрких адипоцита. Комплекси у себи носе гвожђе и калцијум. На тај начин ниво калцијума у мрким адипоцитима се увећава, што је показано хистохемијским и цитохемијским бојењем на нивоу светлосне и електронске микроскопије.

Тако унет калцијум изазива изразите промене митохондријалне популације мрких адипоцита мењајући њихову димензију ка мегамитохондријама, повећавајући њихов биоенергетски капацитет и повечавајући број контактних места са ендоплазмним ретикулумом. Како би се испитала молекулска основа ових структурних промена испитивана је протеинска експресија молекулских играча: митофузина 1 и 2, митофизина Dpr1, као и АТР синтазе, UCP1 и VDAC. У наставку су приказани резултати који показују стереолошке промене митохондрија (дистрибуција митохондрија по средњем дијаметру и по волуменској густини кристи), као и колокализациона анализа митохондрија и ендоплазминог ретикулума.

Резултати приказани у другом делу поглавља **Резултати** се односе на ремоделирање мрких адипоцита у условима физиолошке и супрафизиолошке хиперинсулинемије. Анализирана је експресија молекулских маркера биоенергетског и термогеног капацитета мрких адипоцита како у ткиву, тако и у митохондријама обogaћеној фракцији да би се што прецизније сагледала улога самих митохондрија. Приказани су резултати протеинске експресије компоненти електрон транспортног ланца, цитохрома *c* и АТР синтазе. Потврду описаних молекулских промена на нивоу протеинске експресије након акутног и хроничног третмана инсулином, и то ниском или високом дозом, кандидат проналази у резултатима микроскопских анализа, нарочито имунофлуоресцентно локализационих и колокализационих. Додатно, студирање међуодноса промене структуре и функције митохондрија на нивоу активности АТР синтазе, експресије инхибиторног фактора 1, као и цитохемијска анализа комплекса I и II и водоник пероксида дају обиље приказаних резултата који воде хипотези метаболичког метаболизма. Ово је први пут да је на мрким адипоцитима показан Харлекин ефекат не само на за UCP1 (термогени капацитет), већ и за компоненте OXPHOS (биоенергетски капацитет). Посебно је истакнут резултат експресије инхибиторног фактора 1 којим је показан систем финог модулирања баланса термогеног и биоенергетског капацитета у митохондријама мрких адипоцита. Ови резултати отварају велико поље примене у кориговању нежељених промена на нивоу ћелија и ткива у метаболичком синдрому.

У поглављу **Дискусија** кандидат, следећи концепт који је увео у резултатима, описује њихов значај у светлу до сада познатих података. Разматрају се ефекти деловања калцијума и инсулина на мрке адипоците пацова и њихове митохондрије у контексту продукције топлоте и/или енергије (АТР). Комисија мора да истакне да је део резултата потпуно нов и да је кандидат на изванредан начин дискутовао и критички сагледао њихово значење, али и њихов значај кроз могућу примену суплементсања калцијумом и индуковање транзијентне хиперинсулинемије у сврху модулације метаболизма мрког масног ткива, а тиме и регулисање телесне масе и/или тежине. Посебно, дискутован је значај за човека имајући у виду да је потврђено присуство мрког масног ткива и његова веза са метаболичком активношћу.

У поглављу **Закључци** кандидат јасно и прегледно износи више закључака који су произашли из резултата истраживања докторске дисертације:

Експериментални третман са Са-SANDOZ је показао:

- *Повећање концентрације Ca^{2+} у мрким адипоцитима.* Сам Са-SANDOZ третман доводи до повећања нивоа Ca^{2+} у мрким адипоцитима, што је показано Ализарин Ред С бојењем и локализацијом калијум пироантимонатом. Предложен је алтернативни пут уноса калцијума егзовезикулацијом еритроцита.

- *Структурно ремоделирање митохондрија.* Анализе протеинске експресије, као и ултраструктурне и стереолошке анализе су показале формирање мегамитохондрија, повећање митохондријалне фузије и ремоделирање унутрашње архитектуре митохондрија, односно повећање волуменске густине кристи након Са-SANDOZ третмана.

- *Повећање комуникације између митохондрија и ендоплазмског ретикулума.* Протеинска експресија Mfn2 протеина, ултраструктурна анализа и колокализациона студија су показале повећање интимних контаката између митохондрија и ЕР.

- *Повећање термогеног капацитета мрких адипоцита.* Анализа протеинске експресије и имунохистохемија на UCP1 протеин су показали да долази до повећања термогеног капацитета мрких адипоцита.

Експериментални третман инсулином је показао:

- *Модулацију експресије комплекса електрон транспортног ланца и *cyt c*.* Показано је да инсулин има значајан ефекат на протеинску експресију свих компоненти електрон транспортног ланца, и тај ефекат зависи од примењене дозе инсулина и дужине третмана.

- *Модулацију експресије и активности АТФ синтазе и експресије инхибиторног фактора 1.* Акутна доза инсулина је довела до повећања протеинске експресије АТФ синтазе и IF1, а хронична доза је довела до смањења протеинске експресије АТФ синтазе, а повећања протеинске експресије IF1. Осим тога, активност АТФ синтазе је повећана применом акутне, а смањена применом хроничне дозе инсулина.

- *Модулацију експресије UCP протеина.* Хронични третман инсулином доводи до повећања протеинске експресије UCP1 протеина, што указује да долази до повећања термогеног капацитета мрких адипоцита. Осим тога, инсулин утиче и на протеинску експресију UCP2 и UCP3 протеина.

- *Хетерогеност мрких адипоцита.* Показано је да се мрки адипоцити не одликују само добро познатим Харлекин ефектом у случају UCP1 протеина, већ и да се одликују хетерогеношћу експресије комплекса електрон транспортног ланца, *cyt c*, АТФ синтазе и IF1, што је и показано имунофлуоресцентним методама.

- *Митохондријални мозаицизам.* Анализа на нивоу конфокалне микроскопије је показала да постоји разлика у имуноекспресији биоенергетских и термогених протеина између појединачних митохондрија, што указује да постоји и хетерогеност у погледу биоенергетског и термогеног капацитета ових органела, не само на нивоу ткива већ и на нивоу једног мрког адипоцита.

У поглављу **Литература** са 400 библиографских јединица релевантних по избору и броју, уз навођење најновијих литературних података, уочава се озбиљан и студиозан приступ проблематици од стране кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Golić I, Veličković K, Markelić M, Stančić A, Janković A, Vučetić M, Otašević V, Buzadžić B, Korać B, Korać A. (2014) Calcium-induced alteration of mitochondrial morphology and mitochondrial-endoplasmic reticulum contacts in rat brown adipocytes. *Eur J Histochem*, 58, 251-257. **M23**
2. Markelić M, Veličković K, Golić I, Ukropina M, Čakić-Milošević M, Koko V, Korać A. (2011) Calcium-Sandoz-induced erythrocyte exovesiculation and internalization of hemichromic material into rat brown adipocytes. *Arch Biol Sci*, 63, 309-317. **M23**

B3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Golić I, Markelić M, Veličković K, Janković A, Stančić A, Vučetić M, Otašević V, Buzadžić B, Korać B, Jonić S, Korać A. Insulin induces cristae remodeling by decreasing complex I and increasing UCP1 expression in rat brown adipose tissue, 18th European Bioenergetics Conference – EBEC2014, Lisbon, Portugal, July 12-17, 2014, S2.P7, *BBA – Bioenergetics*, 2014, 1837(suppl.): e26-e27. **M34**
2. Golić I, Veličković K, Markelić M, Vučetić M, Janković A, Buzadžić B, Stančić A, Otašević V, Korać B, Korać A. Calcium-induced mitochondrial fusion in rat brown adipocytes. *Mitochondrial Dynamics: from Mechanism to Disease*. Sardinia, Italy, September 11-15, 2011, P1.10, 2011, pp. 86. **M34**

B4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Golić I, Veličković K, Markelić M, Stančić A, Janković A, Vučetić M, Otašević V, Buzadžić B, Korać B, Korać A. Efekat kalcijuma na interakciju mitohondrija i endoplazminog retikuluma u mrkim adipocitima pacova. Drugi kongres – Život sa slobodnim radikalima: Hemija, Biologija, Medicina. Niš, Srbija, 28. septembar 2013, P18, pp. 56, 2013. **M64**
2. Golić I, Veličković K, Markelić M, Ukropina M, Koko V, Čakić-Milošević M, Korać A. Morfološke promene mitohondrija mrkih adipocita pacova izazvane kalcijumom. Naučni simpozijum Mitohondrije i slobodni radikali – nov izazov. 21. septembar, Beograd, Srbija, 2009, pp. 68-69, 2009. **M64**

Мишљење и предлог Комисије:

Анализа докторске дисертације кандидата **Игора Љ. Голића под насловом „Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова“** показује да је он у својој докторској дисертацији успешно испунио све постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан експериментални рад. Докторска дисертација кандидата представља оригиналан научни рад у области молекуларне биологије ћелије. Кандидат је применио све расположиве методе ћелијске и молекуларне биологије и показао молекулски основ структурног ремоделирања митохондрија мрких адипоцита. Резултати ове тезе први показују метаболички мозаицизам мрких адипоцита кроз мозаицизам молекулских играча

термогеног и биоенергетског капацитета, и њихов значај је у томе да показују да финим модулирањем на нивоу митохондрија може да се постигне регулација метаболизма мрких адипоцита, а тиме и регулише телесна маса и/или температура.

Самосталност у планирању и експериментална реализација истраживања, тумачење и критичко разматрање резултата додатно потврђују да кандидат потпуно влада научном облашћу. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос младог истраживача и имајући то у виду има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације **Игора Љ. Голића** под насловом „Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова“.

КОМИСИЈА:

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

др Весна Оташевић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду-
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Бато Кораћ, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

У Београду, 30.07.2015. године