

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.07.2018. godine, broj 5940/17-TM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ultrastrukturalne promene u limfocitima periferne krvi bolesnika sa Diabetes mellitus-om tip 2“

kandidata dr Tamare Martinović, zaposlene na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Tamara Kravić-Stevović, komentor je prof. dr Katarina Lalić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Akademik Vladimir Bumbaširević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Vladimir Trajković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Miljan Krstić, docent Medicinskog fakulteta u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Tamare Martinović napisana je na ukupno 89 strani i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 7 tabela, 26 grafikona i 17 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano kakvo je oboljenje tip 2 dijabetes melitus. Opisane su njegove glavne karakteristike, kriterijumi za postavljanje dijagnoze i značaj skrininga, koji su faktori rizika i komplikacije bolesti. Opisan je i način lečenja tip 2 dijabetesa sa naglaskom na dve najčešće primenjivane terapije, metformin i insulin.

Detaljno je opisan proces autofagije, njegove morfološke komponente i molekularni putevi, kao i načini detekcije. Napisano je da su dosadašnja saznanja o ulozi autofagije u patogenezi tip 2 dijabetesa kontroverzna, kao i o uticaju hiperglikemije na ovaj proces.

Navedena je i moguća uloga autoimunosti u tip 2 dijabetesu. Detaljno je opisana ultrastrukturalna građa limfocita u perifernoj krvi i značaj autofagije u ovim ćelijama.

Opisane su morfološke promene nukleusa u različitim tipovima ćelija u tip 2 dijabetesu. Ukazano je na izostanak primene savremenih i preciznih metoda analize morfoloških karakteristika nukleusa.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ultrastrukturne morfometrijske analize broja autofagičnih struktura u limfocitima periferne krvi bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom, ultrastrukturne analize aktivacije i oštećenja subcelularnih struktura limfocita, i fraktalne analize nukleusa i citoplazme limfocita. Takođe, kao cilj navedena je i korelacija dobijenih morfometrijskih rezultata autofagičnih struktura sa ekspresijom proteina uključenih u proces autofagije, sa aktivacijom i oštećenjem subcelularnih struktura i sa rezultatima fraktalne analize nukleusa i citoplazme bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena na Institutu za Histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta i Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju. Detaljno je opisano na koji način su formirane grupe bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom: bolesnici sa novootkrivenim tip 2 dijabetesom, bolesnici lečeni metforminom i bolesnici lečeni insulinom, ukupno 21 bolesnik i koji su bili kriterijumi za postavljanje dijagnoze tip 2 dijabetes melitusa. Takođe je opisano koji ispitanici su činili kontrolnu grupu: 7 zdravih ispitanika, odgovarajuće starosti, koji nisu imali maligne i metaboličke bolesti i nisu lečeni statinima. Ova studija je sprovedena u skladu sa preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima, i bila je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ultrastrukturna morfometrijska analiza limfocita periferne krvi sprovedena je na ultratankim isečcima ćelija kontrastiranim uranil-acetatom i olovo-citratom na elektronskom mikroskopu primenom „*Systematic Uniform Random Sampling*“ metode uzorkovanja ćelija. Na tako dobijenim slikama ćelija urađene su morfometrijske analize autofagičnih struktura i drugih ćelijskih organela i analize zapreminskog udela sa dvostrukom „*coherent point*“ mrežicom.

Analiza parametara oblika nukleusa limfocita i površine heterohromatina je urađena primenom programa *ImageJ 1.49*. Fraktalna i teksturalna analiza nukleusa i citoplazme limfocita su urađene u *ImageJ 1.49* programu sa dodacima *FracLac*, *Texture Analyzer* i *GLCMTextureToo*. Detekcija i kvantifikacija autofagičnih struktura, mitofaga i lizozoma urađena je na konfokalnom mikroskopu primenom imunofluorescentnih bojenja sa odgovarajućim antitelima. Protočnom citometrijom je kvantifikovan broj kiselih vezikula u akridin oranž obojenim ćelijama. Primenom imunoblota analizirano je prisustvo autofagije i modulacija signalnih puteva, kvantifikacijom nivoa ekspresije proteina ATG5, Beklina, p62 i LC3. Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije urađeno je primenom reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 129 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Na elektronskom mikroskopu je detektovano da su limfociti bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom imali euhromatične nukleuse nepravilnog oblika sa dubokim usecima i veći broj organela prisutnih u citoplazmi, dok su limfociti zdravih osoba imali okrugle, predominantno heterohromatične nukleuse i malu količinu citoplazme sa retko prisutnim organelama.

Pokazan je statistički značajno veći broj mitohondrija u limfocitima novootkrivenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom i bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike.

Analiza na elektronskom mikroskopu pokazala je statistički značajno povećanje ukupnog broja autofagičnih struktura, kao i povećanje broja autolizozoma u limfocitima novootkrivenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom i bolesnika lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike. Volumetrijska analiza je pokazala statistički značajno veći volumen autofagičnih struktura i autolizozoma kod bolesnika sa tip 2 dijabetesom lečenih metforminom u odnosu na zdrave ispitanike.

Pokazano je da nukleusi bolesnika sa tip 2 dijabetesom imaju statistički značajno veći broj subnuklearnih struktura (nukleolusa, perihromatinskih granula, interhromatinskih granula,

Cajal-ovih tela) u odnosu na zdrave osobe. Analiza parametra oblika nukleusa u *ImageJ* programu pokazala je statistički visoko značajno smanjenje cirkularnosti, oblosti i solidnosti nukleusa kod svih ispitivanih grupa bolesnika sa tip 2 dijabetesom u odnosu na zdrave ispitanike i statistički visoko značajno povećanje proporcije nukleusa kod svih ispitivanih grupa bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. Merenjem površine heterohromatina u nukleusima pokazano je statistički visoko značajno smanjenje površine heterohromatina kod bolesnika sa tip 2 dijabetesom.

Metode fraktalne analize nukleusa i citoplazme pokazale su da postoje statistički značajne razlike u fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti između lečenih bolesnika u odnosu na ostale ispitivanje grupe. Teksturalna analiza nukleusa takođe je pokazala razliku između lečenih bolesnika i ostalih grupa, dok teksturalna analiza citoplazme nije pokazala značajne razlike između ispitivanih grupa.

Analiza LC3B i MitoTracker-om obojenih pločica na konfokalnom mikroskopu pokazala je statistički visoko značajno veći broj mitofaga kod novootkrivenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom u odnosu na zdrave ispitanike, a analiza LC3B i LysoTracker-om obojenih pločica pokazala je statistički visoko značajno veći broj autolizozoma kod zdravih ispitanika u odnosu na novootkrivene bolesnike sa tip 2 dijabetesom. Kvantifikacija LC3B punkta pokazala je statistički visoko značajno veći broj autofagičnih struktura kod novootkrivenih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike, dok je kvantifikacija LysoTracker punkta pokazala statistički značajno veći broj lizozoma kod zdravih ispitanika u odnosu na novootkrivene bolesnike.

Protočnom citofluorimetrijom je pokazano da nema statistički značajne razlike u broju kiselih vezikula između novootkrivenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom i zdravih ispitanika.

Imunoblot analizom je pokazano da nema razlike u ekspresiji proteina uključenih u proces regulacije autofagije između novootkrivenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom i zdravih ispitanika.

Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije je pokazalo statistički značajnu razliku između zdravih ispitanika i novootkrivenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom u nivou ekspresije ATG4b. U nivou ekspresije drugih ispitivanih gena nije pokazana statistički značajna razlika.

Broj autofagičnih struktura korelira sa parametrima oblika nukleusa, procentom površine heterohromatina kao i sa parametrima fraktalne analize nukleusa, ali ne korelira sa parametrima fraktalne analize citoplazme.

Korelacijom ultrastrukturne analize i ekspresije proteina uključenih u proces autofagije pokazano je da ekspresija ATG5 proteina korelira sa fraktalnom dimenzijom nukleusa i citoplazme, a ekspresija p62 proteina korelira sa lakunarnošću nukleusa, brojem nukleolusa i brojem Cajal-ovih tela. Broj mitohondrija korelira sa promenama oblika nukleusa i procentom heterohromatina.

Ekspresija Vps34 korelira sa brojem i volumenom fagofora i autofagozoma, dok ekspresija ATG korelira sa brojem autofagičnih struktura, autolizozoma, mitofaga i parametrima oblika nukleusa. Utvrđena je i korelacija parametara teksturalne analize citoplazme i ekspresije gena FOXO1 i BECN.

Korelacijom nivoa glukoze i vrednosti HbA_{1c} sa morfološkim parametrima pokazano je da nivo glukoze i vrednosti HbA_{1c} koreliraju sa promenama u obliku nukleusa i sa fraktalnom dimenzijom nukleusa. Pokazana je i korelacija broja mitofaga i LC3 punkta sa nivoom glukoze u krvi i vrednostima HbA_{1c}.

Korelacijom lipidnih parametara sa morfološkim parametrima pokazano je da trigliceridi koreliraju sa fraktalnom dimenzijom nukleusa i parametrima teksturalne analize citoplazme, dok nivo ukupnog holesterola i LDL-a u krvi korelira sa površinom autofagičnih struktura i sa ekspresijom Vps34 gena, a nivo HDL-a korelira sa ATG4b, BECN.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova doktorska disertacija je prvo istraživanje u kome je pokazano da su nukleusi limfocita periferne krvi bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom nepravilnog oblika i da se razlikuju od nukleusa zdravih osoba. Nepravilan oblik nukleusa je ranije viđen u oralnim epitelnim ćelijama (Hallikerimath et al., 2011) i u cilijarnom epitelu (Oz et al., 2014) u dijabetesu. Nalaz nepravilnosti oblika nukleusa u još jednom ćelijskom tipu bi mogao da ukaže na činjenicu da su nepravilnosti oblika nukleusa čest nalaz u dijabetesu. Oblik nukleusa limfocita u dijabetesu podseća na nukleuse kakvi se viđaju u ćelijama Sezary sindroma (Lutzner & Jordan, 1968) i u stanjima asociranim sa antigen specifičnom aktivacijom limfocita *in vivo* (Reinhold et al., 1994). Može se špekulisati da nalaz morfoloških promena u nukleusima limfocita može biti zbog aktivacije ovih ćelija koja može voditi nastanku autoimunosti, za

koju se veruje da postoji u tip 2 dijabetes melitusu (Brooks-Worrell et al., 2011; Zhai et al., 2016). Zajedno sa nepravilnostima oblika nukleusa, nađen je i veći procenat euhromatina u nukleusima limfocita bolesnika sa dijabetesom koji može biti povezan sa povećanom transkripcionom aktivnošću ovih ćelija u dijabetesu. Povećani broj nukleolusa u nukleusima limfocita bolesnika sa novootkrivenim tip 2 dijabetes melitusom kao i kod bolesnika lečenih metforminom podržava teoriju da su ove ćelije transkripciono aktivnije nego limfociti zdravih osoba, s obzirom da je nukleolus mesto sinteze ribozomalne ribonukleinske kiseline i spajanja ribozomalnih subjedinica (Tsekrekou et al., 2017).

Fraktalna analiza je pogodna za merenje prostornih parametara nepravilnih bioloških struktura (Mandelbrot, 1982). Analiza fraktalne dimenzije nukleusa je do sada korišćena u analizi tumorskih ćelija (Phulari et al., 2016; Ferro et al., 2011), gde je nađen porast procenta heterohromatina i promenjena prostorna distribucija hromatinske gustine, i u analizi nukleusa apoptotskih ćelija gde su nađene razlike u prečniku i fraktalnoj dimenziji između apoptotskih i neapoptotskih ćelija (Kuo et al., 1998). U ovoj disertaciji je pokazano da su fraktalna i teksturalna analiza bile jedine dve kompjuterske metode analize slike dovoljno senzitivne da otkriju razlike u nuklearnoj strukturi u grupi lečenih i nelečenih bolesnika sa tip 2 dijabetesom.

Korelacija nivoa glukoze u krvi sa morfološkim parametrima nukleusa pokazala je da bolesnici sa većim nivoom glukoze u krvi imaju nepravilniji oblik nukleusa, manji procenat heterohromatina i nižu fraktalnu dimenziju hromatinskih struktura nukleusa. Ranije su otkriveni različiti mehanizmi kojim ugljeni hidrati mogu dovesti do aktivacije gena (Vaulont et al., 2000). Neki geni su regulisani insulinom, dok su drugi regulisani samom glukozom (Vaulont et al., 2000). Na primer, izloženost visokim koncentracijama glukoze kod ljudi indukuje gen transformišućeg faktora rasta $\beta 1$ (engl. Transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$), koji sadrži funkcionalno aktivne elemente koji reaguju na prisustvo glukoze (engl. glucose-response elements, GIRE) (Weigert et al., 2004). Regulacija genske transkripcije glukozom mogla bi da objasni korelaciju nivoa glukoze u perifernoj krvi i strukturnih nepravilnosti oblika nukleusa.

Nedavna istraživanja autofagije u limfocitima periferne krvi dala su oprečene rezultate, od onih koji tvrde da postoji indukcija autofagije u limfocitima periferne krvi (Rovira-Llopis S et al., 2015) do onih koja tvrde da postoji supresija autofagije u ovim ćelijama (Alizadeh S et al., 2018). U gore pomenutim studijama uglavnom su primenjene metode indirektna detekcije

autofagije, a u ovoj disertaciji je prvi put analizirana autofagija u limfocitima u tip 2 dijabetesu upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa. Novija istraživanja su nagovestila da bi nivo glukoze mogao da ima efekat na proces autofagije (Moruno F et al., 2012), a veći broj autofagičnih struktura nađen u limfocitima periferne krvi bolesnika sa tip 2 dijabetesom koji su imali više vrednosti glikemije u vreme vađenja krvi je u skladu sa rezultatima Moruno i saradnika. Povećano prisustvo mitofagije, detektovano na konfokalnom mikroskopu je u skladu sa rezultatima Bhansali i saradnika, koji su istraživali mitofagiju u leukocitima dijabetičnih pacijenata i zaključili da hiperglikemija može dovesti do progresivnog porasta oksidativnog stresa i promene u morfologiji mitohondrija (Bhansali S et al., 2017). Nalaz smanjenog broja LysoTracker punkta kod bolesnika sa tip 2 dijabetes melitusom upućuje na moguću smanjenu kiselost ovih struktura kod tip 2 dijabetesa s obzirom da je LysoTracker vitalna boja koja se nakuplja u kiselim vezikulama unutar ćelija i pojedini autori predlažu da se može koristiti za detekciju abnormalnosti kiselosti ovih struktura (Eskelinen et al., 2004) ili u istraživanjima efikasnosti fuzije autofagozoma i lizozoma (Gonzalez-Polo et al., 2005). Akridin oranž je kao i LysoTracker, boja koja se vezuje za kisele vezikule, u njima se nakuplja i protonuje te tako ostaje zarobljena unutar njih. (Pierzyńska-Mach et al., 2014). Za protonovanje boje i njen ostanak u vezikuli neophodan je nizak pH (Pierzyńska-Mach et al., 2014), te izostanak povećanja broja kiselih vezikula u ovoj studiji ukazuje na promenu pH u lizozomima kod dijabetičnih bolesnika. Novija istraživanja ukazuju na moguću ulogu hiperglikemije u poremećaju procesa autofagije (Demirtas et al., 2016), kao i na uticaj slobodnih masnih kiselina na proces autofagije (Ebato et al., 2008). Korelacija nivoa glukoze i vrednosti HbA1c sa brojem mitofaga i LC3 punkta dobijena u ovoj studiji ukazuje na činjenicu da hiperglikemija ima direktan uticaj na autofagiju u limfocitima periferne krvi .

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. *Martinovic T, Ciric D, Pantic I, Lalic K, Rasulic I, Despotovic S, Lalic I, Djuricic D, Bumbasirevic V, Kravic-Stevovic T. Unusual shape and structure of lymphocyte nuclei is linked to hyperglycemia in type 2 diabetes patients. Tissue Cell 2018; 52:92-100. (M22, IF 1,438)*
2. *Tamara Martinovic, Darko Ciric, Ljubica Vucicevic, Maja Misirkic-Marjanovic, Vladimir Bumbasirevic, Vladimir Trajkovic, Tamara Kravic Stevovic. The presence*

of autophagy in mononuclear blood cells of patients with diabetes mellitus type

II. 1st International Congress of Serbian Pathologists and Cytologists Association, Zlatibor, Serbia, 2016. (Meeting Abstract) *Materia Medica* 2016; 32 (2):1471-1472.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Ultrastrukturalne promene u limfocitima periferne krvi bolesnika sa Diabetes mellitus-om tip 2“ dr Tamare Martinović, je prema našim saznanjima, prvi rad koji opisuje promene u ultrastrukturnim karakteristikama limfocita periferne krvi u tip 2 dijabetesu koristeći složene analize koje obuhvataju detekciju i kvantifikaciju autofagičnih struktura i različitih parametara nukleusa limfocita. Doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju kompleksnih dešavanja unutar ćelija i predstavlja korak ka boljem razumevanju morfoloških promena i mehanizama njihovog nastanka u tip 2 dijabetesu. Disertacija pokazuje da postoje promene u morfološkim karakteristikama limfocita bolesnika sa tip 2 dijabetesom u odnosu na limfocite zdravih ispitanika i da te promene perzistiraju bez obzira na primenjenu terapiju. U ovoj studiji elektronska mikroskopija pokazala se kao senzitivnija metoda kvantifikacije autofagičnih struktura od molekularnih metoda. Detektovanje i kvantifikovanje morfoloških promena u limfocitima u tip 2 dijabetesu može imati potencijalni klinički značaj, pre svega u razumevanju morfoloških promena koje bolest izaziva na nivou ćelija i njihovoj mogućoj ulozi u razvoju bolesti i njenih komplikacija. Poznavanje ovih promena u ćelijama moglo bi dovesti do razvoja novih terapijskih pristupa i lekova koji bi bili usmereni ka sprečavanju i kontroli razvoja morfoloških promena u ćelijama.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Tamare Martinović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 12.07.2018 godine

Članovi Komisije:

Akademik prof. dr Vladimir Bumbaširević

Prof. dr Vladimir Trajković

Doc. dr Miljan Krstić

Mentor:

Prof. dr Tamara Kravić-Stevović

Komentor:

Prof. dr Katarina Lalić
