

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.03.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Есме Исеновић и др Јелене Ђорђевић о урађеној докторској дисертацији **Соње С. Зафировић**, истраживача-сарадника, Института за нуклеарне науке „Винча”, Универзитета у Београду, под насловом **„Ефекат естрадиола на регулацију ендотелне и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних пацова”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. др Есма Исеновић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за нуклеарне науке „Винча”-ментор;
2. др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет-ментор;
3. др Емина Судар Миловановић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за нуклеарне науке „Винча”-члан;
4. др Небојша Јаснић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет-члан;
5. др Милица Лабудовић-Боровић, доцент, Универзитет у Београду-Медицински факултет-члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Соње Зафировић**, под насловом **„Ефекат естрадиола на регулацију ендотелне и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних пацова”**, урађена је у Институту за нуклеарне науке „Винча” у Београду у оквиру пројекта под бројем 173033, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије.

Докторска дисертација је написана на 158 страна куцаног текста и подељена је у уобичајена поглавља: Увод (32 стране), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (20 страна), Резултати (34 стране), Дискусија (28 страна), Закључци (2 стране) и Литература (41 страна). У дисертацији је цитирано 360 библиографских јединица. Докторска дисертација садржи и податке о менторима и члановима комисије, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, биографију аутора и потписане изјаве.

Полазне основе истраживања обухваћених овом тезом:

Хормон естрадиол је важан регулаторни фактор широког спектра физиолошких процеса. Поред утицаја на репродукцију и развој, естрадиол је укључен и у метаболичке процесе у многим органима. Овај хормон остварује позитиван ефекат на кардиоваскуларни систем (КВС), спречавањем настанка атеросклерозе, ендотелне или васкуларне дисфункције, а такође делује и директно на срце смањујући његову хипертрофију. Смањење концентрације естрадиола у организму доприноси развоју метаболичких поремећаја, који могу да доведу и до развоја гојазности, резистенције на инсулин (ИР) као и хипертензије и других кардиоваскуларних болести (КВБ). Гојазност представља хроничан метаболички поремећај, кога карактерише повећање масних депоа у организму што може довести до промена у везивном ткиву и крвним судовима, као и исхемијске кардиомиопатије и хипертрофије леве коморе срца.

Молекулски механизми којима естрадиол остварује позитивне ефекте у КВС укључени су и у регулацију експресије азот-моноксид-синтаза (NOS), ендотелне (eNOS) и индуцибилне (iNOS) форме, које су одговорне за синтезу азот монооксида (NO). Овај сигнални молекул синтетисан у срцу регулише његову функцију директно, а такође утиче и на глатке мишићне ћелије крвних судова, инхибира агрегацију тромбоцита и на тај начин испољава и антиатеросклеротске ефекте.

Осим што директно делује на срце, естрадиол и индиректно регулише његову функцију, делујући на метаболизам и транспорт главних енергетских супстрата, глукозе и слободних масних киселина (СМК). Такође, естрадиол делује и на ренин-ангиотензин систем (RAS), који има важну улогу у кардиоваскуларној физиологији, пре свега у регулацији васкуларног тонуса и крвног притиска.

Кардиопротективно дејство естрадиола посредством NO и ензима који га синтетишу недовољно је познато, стога је разумевање молекулских механизма којима естрадиол утиче на КВС гојазних особа од изузетне важности за развој нових стратегија у лечењу гојазности и КВБ.

Анализа докторске дисертације:

Докторска дисертација кандидата **Соње С. Зафировић**, обухвата уобичајена поглавља. Прво поглавље **УВОД** (32 стране) подељено је у три целине и поткрепљено је са 12 илустрација и једном табелом. У оквиру прве целине поглавља **УВОД**, на прегледан и систематичан начин кандидат је приказао опште особине естрадиола, физиолошке ефекте које естрадиол остварује у срцу као и молекулске механизме деловања естрадиола, са детаљним освртом на геномске и негеномске механизме његовог деловања. Такође, у оквиру ове целине кандидат је приказао опште карактеристике рецептора за естрогене. Међу сигналним путевима низводно од рецептора за естрогене, издвојен је пут који укључује сигналне молекуле: супстрат рецептора за инсулин 1 (IRS-1), фосфатидил-инозитол-3-киназа (PI3K), као и протеин киназа В (Akt), за које је показано да регулишу експресију eNOS и iNOS. Осим тога, кандидат је указао и на улогу RhoA у регулацији експресије eNOS и iNOS. У оквиру друге целине поглавља **УВОД** детаљно су описани ефекти деловања естрадиола у патофизиолошким стањима. Аутор је на детаљан и систематичан начин описао ефекте естрадиола у стањима гојазности и ИР. Такође је истакнут и значај естрадиола у активацији RAS. У трећој целини поглавља **УВОД** детаљно су описане опште карактеристике eNOS и iNOS, као и улога продукта њихове активности NO у КВС. Кандидат је истакао да је NO као слободни радикал укључен у различите физиолошке и патофизиолошке процесе у организму, а нарочито је важно

његово кардиопротективно дејство, које је од велике важности за хомеостазу КВС. У уводном делу постављене су полазне основе на које ће се аутор ослањати у дискусији добијених и приказаних резултата у оквиру ове докторске дисертације.

У поглављу **ЦИЉЕВИ РАДА** (1 страна) аутор на јасан и концизан начин излаже циљеве рада који обухватају изучавање: 1. *in vivo* ефеката естрадиола на регулацију експресије eNOS и iNOS у срцу нормално ухрањених и гојазних пацова; 2. *in vivo* ефеката естрадиола на улогу сигналних молекула IRS-1, PI3K и Akt у регулацији експресије eNOS и iNOS у срцу нормално ухрањених и гојазних пацова; 3. интеракције естрадиола и ангиотензина II (Ang II), као и улоге RhoA у срцу нормално ухрањених и гојазних пацова; 4. *in vivo* ефеката естрадиола на ћелијску локализацију транспортера за СМК и глукозу у срцу нормално ухрањених и гојазних пацова.

У следећем поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** (20 страна) приказан је експериментални протокол и методолошки приступ који је колегиница Соња С. Зафировић користила у својим истраживањима. Детаљно је описан дизајн експеримента, као и поступци руковања експерименталним животињама у складу са препорукама Етичког комитета Института за нуклеарне науке „Винча”.

Описане су спектрофотометријске методе коришћене за мерење концентрације нитрата и нитрита у плазми, као и за мерење концентрације СМК, нитрата, нитрита и L-аргинина (L-Arg) у хомогенату срца; поступци изоловања укупних протеина, протеина плазма мембране и микрозоме мале густине из ткива срца, као и мерење њихове концентрације; електрофореза на полиакриламидном гелу, трансфер протеина на мембрану и имунодетекција eNOS, iNOS, NF-κB-p65, pIRS-1/IRS-1, p85-PI3K, p110-PI3K, pAkt/Akt, RhoA, AT1R, AT2R, CD36, GLUT1 и GLUT4 протеина, као и асоцијација IRS-1 са p85-PI3K протеином; поступци изоловања укупне РНК из ткива срца, препис iRNK у cDNK и RT-PCR у реалном времену употребом специфичних прајмера за eNOS и iNOS гене; имунохистохемијске методе за детекцију eNOS и iNOS протеина у ткиву срца. На крају су представљене статистичке методе (SPSS и Studentov t-test) коришћене при обради добијених резултата. Поглавље садржи две слике и три табеле.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** (34 стране) подељено је у две целине са по 10 потцелина и документовано је са једном табелом и 24 слике на којима су приказана 54 графикана и 10 фотографија имунохистохемијског бојења ткива срца.

Прва целина приказује резултате који описују *in vivo* ефекте естрадиола на регулацију експресије eNOS и iNOS у срцу нормално ухрањених пацова и подељена је на 10 потцелина, док друга целина приказује исте резултате у срцу гојазних пацова и такође је подељена на 10 потцелина.

Добијени и приказани резултати показују да естрадиол смањује концентрацију L-Arg у лизату срца нормално ухрањених животиња, не мења концентрацију NO у лизату, али је повећава у плазми. У срцу гојазних животиња третман естрадиолом смањује концентрацију L-Arg, али нема утицај на концентрацију NO у плазми и лизату срца. Даље, резултати показују да третман естрадиолом не утиче на ниво iRNK и ниво eNOS протеина у срцу нормално ухрањених пацова, али повећава ниво iRNK за eNOS у срцу гојазних пацова. Код обе групе пацова третман естрадиолом смањује ниво iRNK за iNOS, а код нормално ухрањених и ниво iNOS протеина, при чему је изостао ефекат естрадиола на ниво протеина NF-κB-p65, како у срцу нормално ухрањених, тако и у срцу гојазних пацова.

Третман естрадиолом не утиче на ниво IRS-1 протеина, као ни асоцијацију IRS-1 са p85 субјединицом PI3K и ниво p110 субјединице PI3K, али повећава ниво p85 субјединице PI3K и Akt протеина у лизату срца нормално ухрањених пацова. Третман гојазних пацова естрадиолом смањује ниво IRS-1 протеина, повећава асоцијацију IRS-1 са p85 субјединицом PI3K, као и ниво протеина p85, p110 и Akt.

Резултати изучавања интеракције естрадиола са компонентама RAS показују да ињецирани естрадиол смањује ниво RhoA протеина у лизату срца нормално ухрањених и гојазних животиња. Забележен је и изостанак ефекта ињецираног естрадиола на ниво AT1R и AT2R у лизату срца, као и на ниво AT2R на плазма мембрани кардиомиоцита нормално ухрањених пацова, али смањење нивоа AT1R на плазма мембрани кардиомиоцита под утицајем овог хормона. Са друге стране, код гојазних пацова третман естрадиолом смањује ниво AT1R и AT2R на плазма мембрани кардиомиоцита, али повећава ниво AT2R у лизату срца.

Такође, резултати ове докторске дисертације показују да третман естрадиолом повећава ниво GLUT4 на плазма мембрани кардиомиоцита, али не мења ниво овог глукозног транспортера у микрозомалној фракцији ткива обе испитиване групе. Естрадиол не мења ниво GLUT1 у свим фракцијама срца гојазних пацова, као и плазма мембрани кардиомиоцита нормално ухрањених животиња, али смањује његов ниво у микрозомалној фракцији срца. Такође, добијени резултати показују да третман естрадиолом смањује ниво CD36 на плазма мембрани кардиомиоцита обе испитиване групе животиња, што је праћено повећањем нивоа CD36 у микрозомалној фракцији ткива срца код нормално ухрањених, али не и код гојазних животиња, код којих је ефекат естрадиола изостао. Концентрација СМК је снижена након третмана естрадиолом код гојазних животиња, али се не мења код нормално ухрањених пацова.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** (28 страна) кандидат студиозно и критички разматра добијене и приказане резултате. Кандидат је, имајући у виду своје, као и резултате других аутора, указао на промене изазване естрадиолом како код нормално ухрањених, тако и код гојазних пацова, а које се односе на експресију eNOS и iNOS у срцу. Поглавље дискусија је подељено у четири целине и поткрепљено је једним схематским приказом.

Кандидат је у оквиру прве целине поглавља **ДИСКУСИЈА** дискутовао резултате који приказују ефекте естрадиола на концентрацију NO и L-Arg, имајући у виду да је познато да се NO ослобађа као продукт конверзије L-Arg у L-цитрулин у реакцији посредованој NOS ензимима. Анализирани параметри указују да третман естрадиолом повећава концентрацију NO у плазми нормално ухрањених животиња што је у складу са резултатима других аутора, али нема утицај на концентрацију NO код гојазних животиња. Аутор изостанак ефекта естрадиола на концентрацију NO код гојазних животиња објашњава поремећајем у молекулском механизму деловања естрадиола у патолошким стањима, као што је стање гојазности. Даље, резултати показују да третман естрадиолом смањује концентрацију L-Arg у лизату срца обе испитиване групе животиња, што је очекивано и у складу са резултатима добијеним у истраживањима других аутора а може бити последица повећане активности NOS. Даље су дискутовани ефекти естрадиола на експресију eNOS и iNOS у срцу. Резултати испитивања ефеката естрадиола у физиолошким, као и у патофизиолошким стањима попут гојазности, показују да естрадиол утиче на смањење нивоа iRNK за iNOS што је у складу са резултатима добијеним у истраживањима других аутора. Кандидат, међутим, није детектовао очекивано повећање експресије eNOS код естрадиолом третираних нормално ухрањених животиња, али је забележио повећање нивоа iRNK за eNOS код гојазних пацова након третмана естрадиолом што је објаснио могућим удруженим деловањем естрадиола и инсулина код гојазних животиња, будићи да је ниво инсулина повећан у стању гојазности. Анализом имунохистохемијских мерења добијених за eNOS показано је да су у складу са измереним нивоом овог протеина. Међутим, третман естрадиолом није утицао како на ниво, тако и на локализацију iNOS у обе испитиване групе животиња. Аутор овако добијене резултате објашњава коришћењем различитих делова ткива срца за имунохистохемијске анализе и изолацију протеина и RNK. Осим тога, аутор је мерећи ниво NF- κ B-p65, који је укључен у регулацију експресије гена за iNOS, показао да

естрадиол нема утицај на NF- κ B-p65 у овим експерименталним условима и претпоставио да је ефекат који естрадиол остварује на експресију iNOS последица активације неког другог транскрипционог фактора.

Тежња аутора је била да установи да ли је сигнални пут IRS-1/PI3K/Akt укључен у регулацију експресије eNOS и iNOS у срцу естрадиолом третираних нормално ухрањених и гојазних пацова, што је успешно постигнуто и дискутовано у поређењу са подацима из литературе у оквиру друге целине поглавља **ДИСКУСИЈА**. На основу резултата установљено је да третман естрадиолом код гојазних животиња инхибира фосфорилацију IRS-1 на аминокиселини Ser³⁰⁷, и индукује фосфорилацију IRS-1 на специфичним Tyr остацима, чиме се повећава асоцијација IRS-1 са p85 субјединицом PI3K. Асоцијација IRS-1 са p85 стимулише активност PI3K/Akt сигналне каскаде и утиче на повећање експресије eNOS и смањење експресије iNOS. Међутим, третман естрадиолом код нормално ухрањених животиња не утиче на IRS-1, као ни на асоцијацију IRS-1 са p85 субјединицом PI3K, иако стимулише активност PI3K/Akt сигналне каскаде. Аутор претпоставља да естрадиол своје ефекте код нормално ухрањених животиња остварује директном интеракцијом са PI3K, што је и потврђено у студијама других аутора.

Надаље, у трећој целини поглавља **ДИСКУСИЈА**, аутор проучава интеракцију Ang II и естрадиола. Добијени резултати показују да третман естрадиолом може да инхибира деловање Ang II утичући на сигналну каскаду RhoA/ROCK/IRS-1. Естрадиол смањује ниво AT1R и AT2R као и активност RhoA протеина код гојазних пацова.

У четвртој целини поглавља **ДИСКУСИЈА** кандидат анализира ефекат естрадиола на метаболизам и транспорт енергетских супстрата у срцу нормално ухрањених и гојазних животиња. Добијени резултати су дискутовани са аспекта ефеката естрадиола на транспортере масних киселина и глукозе посредством IRS-1/PI3K/Akt сигналне каскаде. Третман естрадиолом је довео до смањења нивоа CD36 и повећања нивоа GLUT4 на плазма мембрани кардиомиоцита нормално ухрањених и гојазних животиња, што је у складу са познатим кардиопротективним ефектима, смањења акумулације масти и повећања уноса глукозе у срце.

У закључку, узимајући у обзир своје резултате, као и литературне податке, аутор сугерише да би естрадиол могао бити један од битних терапеутских молекула у лечењу срчаних поремећаја, будући да поседује кардиопротективно дејство. Разумевање молекулских механизма који су у основи ефеката естрадиола на КВС, како у физиолошким, тако и у патофизиолошким стањима, стога је од велике важности.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** (2 стране), на јасан начин изведени су закључци који у потпуности произлазе из добијених резултата, а одговарају на циљеве ове докторске дисертације. На основу добијених резултата у овој докторској дисертацији, аутор закључује, да естрадиол својим деловањем, смањује експресију iNOS у срцу нормално ухрањених пацова, посредством PI3K/Akt сигналне каскаде, а такође смањује и експресију AT1R и ниво RhoA протеина. Естрадиол активацијом PI3K/Akt сигналне каскаде регулише и транспорт глукозе у срце, повећавајући ниво GLUT4 на плазма мембрани кардиомиоцита нормално ухрањених пацова.

Код гојазних пацова естрадиол смањујући фосфорилацију IRS-1 на Ser³⁰⁷ доводи до повећања асоцијације IRS-1 са p85 субјединицом PI3K и стимулише активност PI3K/Akt сигналне каскаде. Највероватније посредством PI3K/Akt сигналне каскаде естрадиол повећава експресију eNOS и транслокацију GLUT4 на плазма мембрану, а смањује експресију iNOS, као и ниво AT1R, AT2R и RhoA.

Приказани и дискутовани резултати у оквиру ове докторске дисертације о деловању естрадиола у срцу нормално ухрањених и гојазних пацова, представљају значајан допринос разумевању механизма који се налазе у основи патологије гојазности и могу представљати полазну основу за потенцијалну терапију кардиоваскуларних

обољења код мушкараца.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** (41 страна) садржи списак 360 цитираних библиографских јединица. Обимно и адекватно коришћење литературних навода, као и релевантност њиховог избора у потпуности одражава проблематику ове дисертације и указује на студиозан приступ аутора.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

- M21**
1. **Sonja Zafirovic**, Milan Obradovic, Emina Sudar-Milovanovic, Aleksandra Jovanovic, Julijana Stanimirovic, Alan J. Stewart, Samantha J. Pitt, Esma R. Isenovic. 17 β -Estradiol protects against the effects of a high fat diet on cardiac glucose, lipid and nitric oxide metabolism in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017; 5;446:12-20.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.001>
 2. Obradovic M., **Zafirovic S.**, Jovanovic A., Milovanovic ES., Mousa SA., Labudovic-Borovic M., and Isenovic R.E. Effects of 17 β -estradiol on cardiac Na⁺/K⁺-ATPase in high fat diet fed rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 416: 46-56.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.020>
- M22**
1. **Zafirovic S.**, Sudar-Milovanovic E, Obradovic M, Djordjevic J, Jasnic N, Borovic ML, Isenovic ER. Involvement of PI3K, Akt, and RhoA in oestradiol regulation of cardiac iNOS expression. *Curr Vasc Pharmacol.* 2018 Feb 12.
[doi: 10.2174/1570161116666180212142414](https://doi.org/10.2174/1570161116666180212142414).

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

- M34**
1. **Zafirović S.**, Obradović M., Maravić V., Jovanović A., i Isenović R.E. Promene u nivoima triglicerida, fosfolipida i slobodnih masnih kiselina kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom. Treći kongres o hiperlipoproteinemijama Srbije sa Međunarodnim Učešćem, 3-4.Oktobar 2013, Novi Sad, Zbornik radova i sažetaka, str.77.

Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да је докторска дисертација **Соње С. Зафировић** написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Резултати истраживања у оквиру ове дисертације пружају јаснију слику о молекулским механизмима посредством којих естрадиол регулише експресију eNOS и iNOS и транспорт метаболичких супстрата у срцу гојазних пацова. Такође, резултати указују на потенцијално кардиопротективно дејство естрадиола путем смањења нивоа AT1R и AT2R и смањења активности RhoA протеина код гојазних пацова. Кандидат је у својој докторској дисертацији обрадио актуелну тему и добијени резултати представљају оригинални истраживачки допринос бољем разумевању ефеката естрадиола на срце у патолошким стањима гојазности, ИР и хипертензије. Такође, треба истаћи да представљени резултати могу имати и клинички значај пошто разумевање механизма, који се налазе у основи патологије гојазности, ИР и хипертензије може представљати полазну основу за развој потенцијалне супституционе терапије естрадиолом код мушкараца са циљем да се смањи број кардиоваскуларних обољења.

Имајући у виду све напред наведено, као и да су резултати поменутих истраживања инкорпорирани у две публикације у врхунским међународним часописима M21 категорије и једној публикацији у истакнутом међународном часопису (M22), Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Соњи С. Зафировић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Ефекат естрадиола на регулацију ендотелне и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних пацова”.

КОМИСИЈА:

др Есма Исеновић, научни саветник,
Универзитет у Београду-Институт за нуклеарне
науке „Винча”

др Јелена Ђорђевић, редовни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Емина Судар Миловановић, виши научни
сарадник, Универзитет у Београду-Институт за
нуклеарне науке „Винча”

др Небојша Јаснић, ванредни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Милица Лабудовић-Боровић, доцент,
Универзитет у Београду-Медицински факултет

У Београду, 12.03.2018. год.