

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.06.2024. godine, broj 19/XXVI-1/3-KP, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj metformina na energetska status i mitohondrijalnu funkciju
mišićnih ćelija *in vitro*“**

kandidatkinje Kasje Pavlović, zaposlene na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Mentori su prof. dr Nebojša Lalić i prof. dr Ivanka Marković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Jotić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Anđelka Isaković, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Aleksandar Đukić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija Kasje Pavlović napisana je na ukupno 104 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno pet shema, dve tabele i trideset slika. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, kao i pregled sadržaja. Spisak korišćenih skraćenica, pregled korišćenih hemikalija i reagenasa, pregled korišćenih aparata i opreme kao i pregled terminologije respirometrije su dati u formi priloga.

U **Uvodu** kandidatkinja opisuje dijabetes tip 2, navodeći epidemiološke podatke, osnovne odlike patologije i podele dijabetesa, kao i istorijski pregled izučavanja i lečenja ove bolesti. Dalje su opisane patofiziološke karakteristike dijabetesa tipa 2, a detaljno su prikazane promene u metabolizmu skeletnog mišića u tipu 2 dijabetesa - promene u aktivnosti signalnih puteva, metabolizmu ugljenih hidrata i masti, kao i promene u funkciji mitohondrija. Sledi pregled glavnih grupa lekova koji se koriste u farmakološkoj terapiji dijabetesa.

U sledećem odeljku Uvoda objašnjen je metabolizam glukoze u skeletnom mišiću, pregledom mehanizama ulaska, katabolizma i skladištenja glukoze, kao i regulacije ovih procesa. Zatim je detaljno objašnjen proces oksidativne fosforilacije, uključujući opise mehanizama povratnog transporta kao i sastav i funkciju komponenti respiratornog lanca i mehanizam sinteze ATP-a. U Uvodu se takođe objašnjavaju i signalni putevi koji regulišu energetske metabolizam u skeletnom mišiću - insulinski signalni put i signalni put adenzin monofosfatom aktivirane protein kinaze (AMPK). Objasnjeni su i precizirani molekularni događaji koji se nalaze u osnovi prenosa signala i njihov značaj za regulaciju ćelijskog metabolizma.

Poslednji odeljak Uvoda bavi se metforminom, te je opisan istorijat upotrebe ovog leka, a zatim mehanizmi njegovog antidijabetičkog dejstva, uz poseban osvrt na molekularne mehanizme dejstva metformina. Takođe se navode izazovi koji se javljaju pri dizajnu studija koje ispituju molekularne mehanizme dejstva metformina, te značaj dobrog odabira modela istraživanja kao i koncentracija metformina koje se u studijama koriste, radi bolje reproducibilnosti i mogućnosti međusobnog poređenja različitih studija.

Ciljevi rada su precizno definisani. Obuhvataju ispitivanje uticaja metformina na mitohondrijsku respiraciju, energetske i redoks status mišićnih ćelija C2C12, kao i utvrđivanje uticaja metformina na potencijal unutrašnje membrane mitohondrija, produkciju slobodnih kiseoničnih radikala i morfologiju i sadržaj mitohondrija u ovim ćelijama. Takođe, kao cilj se navodi i ispitivanje uticaja metformina na aktivnost i međusobne interakcije signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt, kao i uticaj farmakološke inhibicije komponenti ovih signalnih puteva na prethodno navedene mitohondrijske parametre.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o eksperimentalnoj studiji koja podrazumeva rad na mišjoj ćelijskoj liniji mioblasta C2C12. Detaljno su opisane metode svih eksperimenata koji ispituju efekte metformina na ćelijski vijabilitet i proliferaciju, unos glukoze u ćelije, mitohondrijsku funkciju (respiraciju, potencijal unutrašnje mitohondrijske

membrane, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta), broj i morfologiju mitohondrija, energetski i redoks status ćelija, kao i aktivnost relevantnih signalnih puteva. Takođe su navedene sve potrebne hemikalije, reagensi za izvođenje eksperimentalnih procedura i svi korišćeni aparati i instrumenti. Opisan je i način dobijanja, analize, statističke obrade i predstavljanja svih eksperimentalnih rezultata.

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 odgovaraju postavljenim ciljevima i sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** je savremena i aktuelna i sadrži spisak od 296 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Proverom originalnosti doktorske disertacije „**Uticaj metformina na energetski status i mitohondrijalnu funkciju mišićnih ćelija *in vitro***“ autorke Kasje Pavlović, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi 10% (*similarity index*). Ovaj stepen podudarnosti u najvećoj je meri posledica navođenja korišćenih hemikalija i reagenasa, navođenja korišćene opreme i univerzalnih eksperimentalnih protokola, kao i prethodno publikovanih rezultata koji su proistekli iz disertacije, a što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Pokazano je da visoke koncentracije metformina, u milimolarnom opsegu, smanjuju vijabilitet ćelija, kao i da ove, suprafarmakološke koncentracije metformina dovodi do smanjene proliferacije C2C12 ćelija. Zatim je pokazano da suprafarmakološka, ali ne i terapijska koncentracija metformina, dovodi do jednog od pretpostavljenih terapijskih efekata metformina u mišićnim ćelijama - povećanog unosa glukoze.

Detaljnim ispitivanjem mitohondrijske respiracije, pokazano je da delujući na funkciju kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija, metformin inhibira mitohondrijsku funkciju intaktnih i permeabilizovanih ćelija. Pokazano je da je minimalna koncentracija koja dovodi

do inhibicije respiracije iznosi 1 mM, kada je trajanje tretmana metforminom 24 h. Terapijska koncentracija metformina (50 μ M), sa druge strane, ne utiče na respiraciju ni pri dužem trajanju tretmana (5 dana). Dodatno, suprafarmakološka koncentracija metformina (5 mM) je gotovo trenutno dovela do inhibicije kompleksa I respiratornog lanca, a takođe je inhibirala i respiraciju intaktnih C2C12 ćelija. Istovremeni tretman insulinom nije uticao na efekte terapijske ni suprafarmakološke koncentracije metformina na respiratornu funkciju mitohondrija. Utvrđeno je da ni jedna od ispitivanih koncentracija metformina nije dovela do promene energetskog (odnos ADP/ATP) i redoks (odnos NAD/NADH) statusa C2C12 ćelija, pri čemu istovremeni tretman insulinom nije uticao na ove parametre.

Tretman metforminom suprafarmakološke koncentracije (5 mM) izazvao je povećanu proizvodnju svih reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali samo u uslovima kada su C2C12 ćelije gajene u medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (HG), dok je isti tretman izazvao povećanu proizvodnju superoksidnog anjon radikala kod ćelija gajenih u oba medijuma, ali je efekat bio izraženiji kod onih gajenih u HG medijumu. Suprafarmakološka, ali ne i terapijska, koncentracija metformina dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija. Za razliku od produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, depolarizacija mitohondrija uočena je u C2C12 ćelijama gajenim u oba medijuma i pri ispitivanju kraćih tretmana metforminom koncentracije 5 mM, počevši od 6 sati. Utvrđeno je da istovremeni tretman ćelija insulinom ne utiče na navedene efekte terapijske i suprafarmakološke koncentracije metformina koji se odnose na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, superoksidnog anjon radikala i depolarizaciju unutrašnje mitohondrijske membrane.

Zastupljenost mitohondrija u ćelijama i njihova aktivnosti su ispitivani metodama protočne citofluorimetrije i konfokalne mikroskopije, korišćenjem fluorescentne boje specifične za mitohondrije (MitoTracker Red), kao i merenjem aktivnosti mitohondrijskog enzima citrat sintaze. Protočnom citofluorimetrijom nije uočena promena u sadržaju i aktivnosti mitohondrija u ćelijama, dok je konfokalnom mikroskopijom uočeno da ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze, a tretirane suprafarmakološkom koncentracijom metformina, sadrže manji broj mitohondrija. Morfološka analiza je pokazala da su mitohondrije u ovim ćelijama veće po površini i izduženije od mitohondrija netretiranih, kontrolnih ćelija. Utvrđeno je i da istovremeni tretman insulinom nije uticao na pokazane efekte metformina na brojnost i morfološke karakteristike mitohondrija C2C12 ćelija.

Aktivnost signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt procenjavana je na osnovu nivoa fosforilacije ključnih proteina (AMPK, ACC, Akt, GSK3 β). Pokazano je da do aktivacije signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt dolazi u uslovima primene suprafarmakološke koncentracija metformina, dok primena terapijske koncentracije metformina ne utiče na aktivaciju ovih signalnih puteva. Uz to, pokazano je i da u slučaju istovremene primene insulina i metformina izostaje fosforilacija AMPK, u uslovima kada su ćelije gajene u HG medijumu, dok ovaj kombinovani tretman nije uticao na promenu nivoa aktivacije (fosforilacije) Akt kinaze u odnosu na uslove kada je primenjen samo insulin. Važnost ovih signalnih puteva u efektima metformina na mitohondrijsku respiraciju je ispitana farmakološkom inhibicijom aktivnosti proteina Akt i AMPK, gde je pokazano da je inhibicija mitohondrijske respiracije koju uzrokuje metformin nezavisna od signalnih puteva PI3K/Akt i AMPK.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj različitih koncentracija antidijabetičkog leka metformina na funkciju mitohondrija i aktivaciju signalnih puteva značajnih za metabolizam glukoze u C2C12 mioblastima.

Veliki broj podataka iz literature ukazuje na to da metformin utiče na preživljavanje tumorskih ćelija i ukazuje na njegovo citotoksično dejstvo pri korišćenju milimolarne koncentracije ovog leka (Zhao et al, 2018; Teh et al, 2019), dok su rezultati na normalnim, netumorskim ćelijama oskudni i nekonzistentni, čak i pri korišćenju istog tipa ćelija (Deng et al, 2018; Wang et al, 2018). Rezultati ovog istraživanja su jasno ukazali na to da do smanjenja vijabiliteta mišićnih ćelija dolazi u uslovima primene suprafarmakološke koncentracije metformina, dok terapijske, tj. one koje se mogu izmeriti u krvi pacijenata koji primaju ovaj lek, nemaju uticaj na njihovo preživljavanje.

Jedan od pretpostavljenih mehanizama terapijskog dejstva metformina u mišiću pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 jeste povećanje unosa glukoze u ćelije, što je prethodno pokazano na ćelijskim linijama, eksperimentalnim životinjama i kod ljudi (Kristensen et al, 2013, Sarabia et al, 1992, Polianskyte-Prause et al, 2019). S druge strane, postoje i podaci da metformin ne utiče na unos glukoze u mišić čoveka, u uslovima *in vivo* ili *ex vivo* (Hallsten et al, 2002; Galuska et al, 1994). U ovom istraživanju je pokazano da samo suprafarmakološke doze metformina povećavaju unos glukoze u ćelije, nezavisan od insulina.

Glavni pretpostavljeni mehanizam dejstva metformina jeste inhibicija kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija, koja je dokazana u brojnim studijama (El-Mir et al, 2000; Carvalho et al, 2008; Pecinova et al, 2017), ali pri korišćenju suprafarmakoloških koncentracija metformina, što nameće pitanje o značaju ovog mehanizma u uslovima primene terapijskih koncentracija leka. Takođe, poznato je i da su koncentracije metformina potrebne da izazovu inhibiciju kompleksa I u mikromolarnom opsegu za intaktne ćelije, a u milimolarnom za izolovane mitohondrije (Owen et al, 2000; Bridges et al, 2014), što se objašnjava mogućom akumulacijom naelektrisanih molekula metformina u matriksu mitohondrija usled postojanja mitohondrijskog membranskog potencijala. U ovoj doktorskoj disertaciji su mereni efekti kako mikromolarnih tako i milimolarnih koncentracija metformina. Pokazano je da visoke koncentracije metformina u permeabilizovanim mišićnim ćelijama inhibiraju mitohondrijsku respiraciju vezanu za kompleks I, i to u OXPHOS stanju (respiracija koja je spregnuta sa sintezom ATP-a), što je u skladu sa podacima iz literature (Yoval-Sanches et al, 2022). U intaktnim ćelijama metformin je smanjio respiraciju u sva tri merena respiratorna stanja (OXPHOS, LEAK i ET), pri čemu smanjenje kapaciteta za transport elektrona (ET), koji predstavlja respiraciju u uslovima razdvajanja transporta elektrona od sinteze ATP-a, ukazuje da je ova inhibicija respiracije nezavisna od mitohondrijskog membranskog potencijala, na šta ukazuju i drugi autori (Emelyanova et al, 2021; Wang et al 2019). Mitohondrijska respiracija je bila neizmenjena kada su ćelije tretirane mikromolarnom koncentracijom metformina, čak i kada je tretman trajao 5 dana, iako u literaturi postoje podaci da niske koncentracije metformina mogu dovesti do povećanja respiracije, verovatno stimulacijom biogeneze mitohondrija (Emelyanova et al, 2021).

Ranija istraživanja pokazuju da inhibicija respiratornog lanca uzrokovana metforminom dovodi do smanjenja sinteze ATP-a i pada u energetsom statusu ćelije (Foretz et al, 2010). U novijim istraživanjima pokazano je da metformin ne menja energetske status tretiranih ćelija (Alshawi et al, 2019; Madiraju et al 2014), što je rezultat i ovog istraživanja. U uslovima inhibicije kompleksa I, odnos redukovanog i oksidovanog oblika NAD se menja u korist redukovane forme, tako da je u literaturi pokazano da metformin ili povećava nivo redukovane forme NAD (Maurer et al, 2023), ili ne utiče na redoks status ćelija (Madiraju et al, 2014), kako je pokazano i u ovom istraživanju.

Podaci u literaturi o uticaju metformina na sintezu reaktivnih kiseoničnih vrsta nisu konzistentni. Naime, pojedini autori navode da metformin dovodi do smanjenja produkcije radikala (Emelyanova et al, 2021), drugi tvrde da metformin ne utiče na ROS (Carvalho et al,

2008), ali ima i publikacija u kojima je pokazano da metformin povećava stvaranje slobodnih radikala (Dykens et al, 2008). Ove studije se značajno razlikuju u pogledu korišćenih koncentracija, dužine trajanja tretmana, kao i uzorka koji je korišćen (ćelije, animalni modeli, izolovane mitohondrije), što donekle može objasniti njihovu nesaglasnost. U ovom istraživanju suprafarmakološka koncentracija metformina koja je uzrokovala inhibiciju mitohondrijske respiracije istovremeno dovodi i do povećanog stvaranja slobodnih kiseoničnih vrsta. Pokazano je i da ista koncentracija dovodi do depolarizacije mitohondrijalne membrane, što je u skladu sa podacima iz literature (Carvalho et al, 2008).

Rezultati studija koje su ispitivale uticaj metformina na količinu mitohondrija u skeletnom mišiću ukazuju na izostanak bilo kakvih promena (McKenzie et al, 2022; Suwa et al, 2006, Crocker et al, 2020), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije koji se odnose na sadržaj i aktivnost mitohondrija u ćelijama, merena protočnom citofluorimetrijom i merenjem aktivnosti citrat sintaze. Sa druge strane, korišćenjem konfokalne mikroskopije pokazano je da suprafarmakološka koncentracija metformina uzrokuje smanjenje broja i povećanje površine mitohondrija u mišićnim ćelijama koje su gajene u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze.

Jedan od široko prihvaćenih mehanizama koji objašnjava unutarćelijske efekte metformina je aktivacija adenozin monofosfatom aktivirane kinaze (AMPK). Ova studija je pokazala da suprafarmakološka koncentracija metformina dovodi do aktivacije AMPK u C2C12 ćelijama, što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (Chen et al, 2011; Bruckbauer et al, 2013; Pavlidou et al, 2017), ali to nije pokazano u uslovima primene terapijske koncentracije. Slično, suprafarmakološka koncentracija metformina je uticala i na aktivaciju PI3K/Akt signalnog puta. Iako je u literaturi pokazano da metformin povećava senzitivnost ćelija prema insulinu (Wu et al, 2015, Zabielski et al, 2017; Bradley et al, 2019), u našem istraživanju ovaj efekat nije zapažen.

Važan metodološki aspekt istraživanja ovog tipa je uzimanje u obzir koncentracije glukoze u medijumu u kojem se ćelije gaje, zato što metformin terapijsko dejstvo ostvaruje u uslovima hiperglikemije. Tako je pokazano da su tumorske ćelije osetljivije na citotoksično dejstvo metformina u odsustvu glukoze (Samuel et al, 2017), dok je kapacitet oksidativne fosforilacije netretiranih C2C12 ćelija gajenih u LG medijumu veći od onih gajenih u HG medijumu, što se objašnjava Varburg-Krebtri efektom (Marroquin et al 2007, de Kok et al, 2021). U ovoj doktorskoj disertaciji je pak pokazano da se kod mišićnih ćelija koje su gajene

u LG medijumu i tretirane suprafarmakološkom koncentracijom metformina, uočava veća inhibicija respiracije, izraženija depolarizacija mitohondrija i aktivacija AMPK i PI3K/Akt signalnih puteva, u odnosu na ćelije gajene u HG medijumu. Uz to, u ćelijama koje su gajene u HG medijumu nastajalo je više slobodnih kiseoničnih vrsta, nezavisno od tretmana metforminom, što je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da hiperglikemija može u mnogim tkivima da izazove oksidativni stres (Fiorentino et al, 2013, Luc et al, 2019).

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je i kako insulin utiče na efekte metformina u ćeliji, te je pokazano da njihova istovremena primena nema uticaja na efekat metformina na mitohondrijsku respiraciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, mitohondrijski membranski potencijal i zastupljenost i morfologiju mitohondrija u C2C12 ćelijama, iako postoje podaci da insulin stimuliše mitohondrijsku funkciju i sintezu ATP-a (Nisir et al, 2014; Stump et al, 2003). Kod ćelija gajenih u LG medijumu, suprafarmakološka koncentracija metformina u kombinaciji sa insulinom je dovela do aktivacije signalnih puteva AMPK i Akt, dok je ovaj efekat izostao kod ćelija gajenih u HG medijumu. U uslovima primene farmakoloških inhibitora AMPK (dorzomorfin) i Akt (10-DEBC hidrohlorid), inhibicija ovih signalnih puteva nije imala uticaja na prethodno opisani inhibitorni efekat metformina na mitohondrijsku respiraciju, što ukazuje da efekti metformina na mitohondrijsku respiraciju ne zavise od aktivnosti signalnih puteva AMPK i PI3K/Akt.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Kasja Pavlovic, Nina Krako Jakovljevic, Andjelka M. Isakovic, Tijana Ivanovic, Ivanka Markovic, Nebojsa M. Lalic. **Therapeutic vs. Suprapharmacological Metformin Concentrations: Different Effects on Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle Cells *in vitro***. Front Pharmacol. 2022;13:930308.doi: 10.3389/fphar.2022.930308. M21 IF = 5,6

Kasja Pavlović, Nebojša M. Lalić. **Ćelijski modeli za proučavanje mišićne insulinske rezistencije**. Medicinski podmladak. 2021;72(1):50-7. doi: 10.5937/mp72-31381. M23

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Uticaj metformina na energetska status i mitohondrijalnu funkciju mišićnih ćelija *in vitro***“ kandidatkinje Kasje Pavlović, predstavlja originalan naučni doprinos razjašnjavanju molekularnih mehanizama dejstva metformina, sa fokusom na efekte metformina na energetska metabolizam mišićne ćelije i funkciju mitohondrija. Od posebnog je značaja to što je u disertaciji razmatrana adekvatnost eksperimentalnog dizajna bazičnih studija koje ispituju efekte metformina, pre svega sa aspekta korišćenih koncentracija i ekstrapolacije dobijenih rezultata u klinički kontekst, naročito uzimajući u obzir široku terapijsku primenu ovog leka u terapiji dijabetesa tip 2, ali i brojnim drugim oboljenjima.

Ova doktorska disertacija je u skladu sa svim principima dobro osmišljenog i sprovedenog naučnog istraživanja. Po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, pažljivo odabranom naučnom pristupu, iskorišćenju savremenoj metodologiji, sistematično prikazanim i diskutovanim rezultatima, odgovarajuće izvedenim zaključcima kao i obilju korišćene literature, ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada.

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

u Beogradu, 04.07.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandra Jotić

Doc. dr Anđelka Isaković

Prof. dr Aleksandar Đukić

Mentori:

Prof. dr Nebojša Lalić

Prof. dr Ivanka Marković