

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ		
1. Датум и орган који је именовано комисију: Наставно-научно веће Универзитета у Новом Саду Природно-математичког факултета на 7. седници одржаној 17.03.2022. године		
2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> :		
1. Др Андрић Силвана	Редовни професор	Физиологија животиња, 21.07.2009. године.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду		председник
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
2. Др Костић Татјана	Редовни професор	Физиологија животиња, 07.07.2008.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду		члан ментор
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
3. Др Каишаревећ Соња	Редовни професор	Физиологија животиња, 01.01.2022.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду		члан
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
4. Др Којић Звездана	Редовни професор	Медицинска физиологија, 04.07.2012.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Медицински факултет, Универзитет у Београду		члан
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
5. Др Ђорђевић Ана	научни саветник	Молекуларна ендокринологија, 16.12.2019.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитет у Београду		члан
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ		
1. Име, име једног родитеља, презиме: Марија Љубиша Медар		

2. Датум рођења, општина, држава: 13.08.1990., Кикинда, Србија
3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив: Природно-математички факултет, Дипломске академске студије биологије – Мастер биолог (модул молекуларни биолог)
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2014. година, Доктор наука – биолошке науке

III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Улога глукокортикоида у циркадијалној синхронизацији ендокрине функције Leydig-ових ћелија

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација припада научној области Биологија, ужој научној области Физиологија животиња. Написана је на српском језику, латиничним писмом. Резиме је приказан на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи 140 страница, А4 формата. Текст је подељен у 8 нумерисаних поглавља: 1. Увод, 2. Преглед литературе, 3. Циљеви, 4. Материјал и методе, 5. Резултати, 6. Дискусија, 7. Закључци и 8. Литература.

Дисертација садржи 32 слике, 14 табела и 261 литературни навод. Након поглавља литература следи биографија кандидаткиње и план третмана података.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације

Наслов ове докторске дисертације “Улога глукокортикоида у циркадијалној синхронизацији ендокрине функције Leydig-ових ћелија” јасно и недвосмислено упућује на тему истраживања и садржај дисертације.

1. Увод

У овом поглављу истакнута је улога глукокортикоидима посредованог одговора на стресне ситуације и биолошког часовника у одржавању хомеостазе организма и репродуктивне способности, и указано је на значај оваквих истраживања за савремени стил живота.

Комисија сматра да је поглавље написано јасно, сажето и стилем разумљивим широј популацији и научној заједници.

2. Преглед литературе

Преглед литературе је у складу са темом и циљевима истраживања подељен у три целине (подпоглавља).

2.1. **Биолошки ритмови.** Ово потпоглавље садржи преглед литературних података о основним карактеристикама биолошког часовника и циркадијалног часовника сисара. Описана је организација часовника на молекуларном нивоу као и значај гена контролираних часовником у репродукцији.

2.2. **Стрес и глукокортикоиди.** Ово потпоглавље дефинише различите врсте стреса као и одговор организма на стресне стимулусе. Посебна пажња је посвећена улози глукокортикоида у одговору организма на стресне ситуације, циркадијалном ритму секреције глукокортикоида, функцији глукокортикоидног рецептора, као и утицају глукокортикоида на елементе часовника.

2.3. **Leydig-ове ћелије.** Ово потпоглавље претставља литературни преглед података о стероидогеној активности Leydig-ових ћелија, као и регулацији стероидогенезе. Такође наведени су подаци о регулаторном утицају глукокортикоида на стероидогенезу.

Сумирано, у поглављу Преглед литературе наведени су познати подаци везани за ритмичну

активност Leydig-ових ћелија као и ефекте стреса на продукцију тестостерона. Указано је на дискутабилне и недовољно изражене аспекте везане за тему докторске дисертације. Тиме је оправдана и потврђена потреба за истраживањима везаним за докторску дисертацију и дата је основа за дефинисање циља дисертације.

Комисија сматра да је поглавље Преглед литературе написано јасно и систематично. Доступним литературним подацима је потврђен интерес и потреба за испитивањем улоге глукокортикоида у циркадијалној синхронизацији ендокрине функције Leydig-ових ћелија.

3. Циљеви докторске дисертације

У овом поглављу конципиран је и дефинисан општи циљ истраживања, а потом и специфични циљеви.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су осмишљена са циљем да се испита хипотеза о регулаторном утицају глукокортикоида на циркадијалну активност Leydig-ових ћелија. Са тим у вези постављени су следећи циљеви:

Испитати ефекте глукокортикоида на образац експресије гена часовника, гена повезаних са стероидогенезом, као и других гена од значаја за ендокрину функцију Leydig-ових ћелија на моделима:

- акутног и понављаног стреса;
- мужјака пацова третираних синтетским глукокортикоидима;
- примарне културе ћелија.

Испитати посредовање глукокортикоидног рецептора у промени циркадијалног образаца генске експресије користећи моделе *in vivo* интратестикуларне и *ex vivo* рецепторне блокаде.

Утврдити корелацију између циркадијалне флукуације глукокортикоида и глукокортикоидног рецептора у Leydig-овим ћелијама и транскрипције испитиваних гена.

Анализирати ефекте стресом изазваног пораста глукокортикоида на транскрипцију гена повезаних са часовником и стероидогенезом у зависности од диурналног времена.

На основу добијених резултата и литературних података, дефинисати могући механизам деловања глукокортикоида на циркадијални часовник и елементе стероидогенезе у Leydig - овим ћелијама.

Комисија сматра да су циљеви ове дисертације јасно дефинисани, правилно конципирани и да су у складу са пријавом теме и садржајем дисертације

4. Материјал и методе

Ово поглавље даје детаљне и прецизне информације о експерименталним моделима, животињама, припреми узорака, лабораторијским и статистичким методама као и хемикалијама и њиховом пореклу. Истакнуто је да су сви експерименти одобрени од стране локалног Етичког комитета Универзитета у Новом Саду и наведен је број одлуке која садржи дозволу. Коришћени су *in vivo* експериментални приступи који имитирају пораст глукокортикоида у циркулацији: имобилизациони стрес у различитим периодима дана (једнократан и понављани), третман животиња са синтетским глукокортикоидом, интратестикуларна блокада глукокортикоидног рецептора у стресним условима. Такође, *ex vivo* огледима на изолованим Leydig-овим ћелијама су ближе дефинисани ефекти глукокортикоида на гене часовника и продукцију тестостерона. Описане су методе за одређивање биохемијских, молекуларно-биолошких и физиолошких параметара (ниво хормона у циркулацији и ћелијском медијуму, релативна експресија гена и протеина, активност животиња итд). Методе за обраду података као и програмски пакети који су

коришћени су прецизно наведени. Примењене методе су адекватне за остваривање описаних експерименталних поставки и циљева истраживања. Све методе су верификоване у одговарајућим научним публикацијама.

Комисија сматра да су коришћени материјал и методе адекватни. Методе за реализацију наведених циљева истраживања су савремене, довољно детаљно описане, прецизне и адекватне за добијање валидних резултата. Изабране методе статистичке обраде података су одговарајуће и примерене типу анализираних података.

5. Резултати

Сви резултати су приказани у форми слика или табела које су детаљно описане. Свака слика и табела садржи детаљну легенду која укључује и опис методологије настанка резултата. Нивои статистичке значајности разлика су јасно дефинисани и видљиви. Поглавље је подељено у шест целина према примењеним експерименталним моделима и циљевима истраживања.

5.1. *Испитивање ефекта једнократног стреса, примењеног у различитим циркадијалним временима, на активност Leydig-ових ћелија.* Резултати, добијени коришћењем наведеног експерименталног модела, јасно потврђују негативан ефекат стреса на ниво тестостерона у циркулацији али и циркадијалну ритмичност ендокрине функције Leydig-ових ћелија и истичу време као битан фактор који обликује одговор на стресне ситуације. Транскрипциона анализа је указала на гене часовника у Leydig-овим ћелијама који би могли да имају улогу у ресетовању ритма као и на стероидогене гене чија се активност мења у условима стреса. Такође, резултати су показали различит одговор стероидогених гена у зависности од времена дешавања стресогене ситуације: највећи ефекат је изазвао стрес у неактивној фази, док стрес у активној фази углавном није значајно утицао на транскрипцију испитиваних стероидогених гена.

5.2. *Испитивање ефекта понављаног стреса, примењеног у различитим циркадијалним временима на активност Leydig-ових ћелија.* У условима понављаног стреса образац промене транскрипције гена повезаних са стероидогенезом као и гена часовника је врло сличан ономе детектованом у једнократном стресу те се гени чија је транскрипциона активност измењена могу посматрати као маркери стреса. Међутим, понављани стрес у активној фази дана, због изостанка ефекта на транскрипцију стероидогених гена, не доводи до значајног пада тестостерона у циркулацији.

Наведене промене у експресији гена су у вези са измењеном сигнализацијом глукокортикоида у Leydig-овим ћелијама у условима стреса тј. са измењеним циркадијалним профилем глукокортикоидног рецептора (*Nr3c1/NR3C1*) и са порастом глукокортикоида у циркулацији (негативна корелација са *Cyp11a1*, *Hsd3b1/2* као и *Reverba*, а позитивна са *Per1*).

5.3. *Испитивање ефекта стреса примењеног на почетку неактивне фазе на циркадијалну активност Leydig-ових ћелија.*

5.4. *Испитивање ефеката in vivo третмана синтетичким глукокортикоидом на циркадијалну активност Leydig-ових ћелија.*

Анализом ефеката глукокортикоида ендогено продукованих у стрес реакцији (5.3.) и егзогено примењених (5.4.) на истој временској скали утврђено је да постоји велика сличност у одговору гена часовника *Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2* што указује на глукокортикоиде као посреднике ефеката стреса на часовник у Leydig-овим ћелијама. Такође, поређење варијабилности података о степену експресије гена повезаних са стероидогенезом потврдило је да оба третмана изазивају сличне одговоре на *Nr3c1*, *Star*, *Hsd3b1/2*, и *Cyp17a1* што поново указује на глукокортикоиде као важне елементе у обликовању ритмичне активности Leydig-

ових ћелија.

5.5. Испитивање ефеката *in vivo*/интратестикуларне блокаде глюкокортикоидног рецептора у условима стреса. Резултати добијени блокадом тестикуларних рецептора за глюкокортикоиде у условима стреса потврђују посредовање ових рецептора у ефектима стреса на *Per1/2* и *Reverba/б*.

5.6. Испитивање ефеката *ex vivo* бокаде глюкокортикоидног рецептора у Leydig-овим ћелијама. Резултати добијени на примарној култури Leydig-ових ћелија, применом агонисте и антагонисте глюкокортикоидног рецептора, указују на директан ефекат глюкокортикоида у регулацији транскрипције *Per1/2* и *Reverba*.

Комисија сматра да је кандидаткиња адекватно и систематично представила резултате, да су они јасно протумачени, те да су оправдали остваривање постављених циљева истраживања.

6. Дискусија

Ово поглавље је подељено у шест потпоглавља у којима су дискутовани резултати добијени истраживањима у оквиру ове докторске дисертације. Такође, у дискусији су сумирани добијени резултати кроз графиконе и мапа груписаних слика и упоређени су са доступним резултатима других истраживања која су имала сличне циљеве. Дат је и критички осврт на недостатке досадашњих истраживања и предложена могућа решења. Сви наводи дати у дискусији у складу са научним сазнањима и савременим истраживачким темама.

Комисија сматра да је написана дискусија у складу са резултатима и циљевима истраживања. Литературни подаци са којима су поређени резултати дисертације су актуелни, објављени у часописима високог ранга везаним за област.

7. Закључци

Ово поглавље на основу резултата и дискусије систематично приказује закључке.

Комисија сматра да су закључци докторске дисертације у складу са постављеним циљевима и добијеним резултатима, те да су формулисани јасано, систематично и концизно.

8. Литература

Литература је цитирана на одговарајући начин. Изабране референце су адекватне тематици дисертације. Значајан број радова су тзв. “пионирски радови“, а највећи број литературних навода подразумева радове објављене у току последњих година у релевантним научним часописима, као и одређен број ревија.

Комисија сматра да су литературни наводи адекватно одабрани, актуелни и у складу са проблематиком дисертације. На основу одабраних референци Комисија закључује да кандидат одлично познаје област и предмет истраживања дисертације.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у складу са *Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду* који је повезан са садржајем докторске дисертације. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду уредника часописа о томе.

M21 (Рад у врхунском међународном часопису)

1. **Medar MLJ**, Andric SA & Kostic TS (2021): Stress-induced glucocorticoids alter the Leydig cells' timing and steroidogenesis-related systems. *Mol Cell Endocrinol* 538:111469. doi: 10.1016/j.mce.2021.111469 (IF-4.291)

M34 (Саопштења са међународног скупа штампано у изводу)

1. **Medar MLJ**, Andric SA, Kostic TS (2021). Stress-induced glucocorticoids alter the Leydig cells` timing and steroidogenesis-related systems. 8th Joint International PSU-UNS Bioscience Conference – IBSC 2021. Novi Sad, Serbia 25-26. Novembar 2021.
2. Kostic TS, **Medar MLJ**, Baburski AZ, Andric SA (2019). Endocrine function of the rat Leydig cells is most compromised by morning stress. 52nd Annual conference “Beyond Possible: Remarkable Transformation of Reproductive Biology”. San Jose, CA, 18. – 21. Jul 2018.
3. **Medar MLJ**, Baburski AZ, Andric S, Kostic S (2018). Immobilisation stress affect the circadian rhythm of Leydig cell endocrine function. The 18th YSF and 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic 04.-12. Jul 2018.
4. **Medar MLJ**, Baburski AZ, Andric SA, Kostic TS (2017) One and ten time repeated immobilization stress affects the circadian expression pattern of Steroidogenic and Clock Genes in Rat Leydig cells. The Fifth International Experimental Biology and Medicine Conference, Biological Clock: Mechanisam and Application. Rijeka, Hrvatska 06 – 08. Oktobar 2017.

M64 (Саопштења са националног скупа штампано у изводу)

1. Becin A, Marinkovic D, **Medar MLJ**, Andric SA, Kostic TS (2017) Time-dependent changes in the rat Leydig cells primary culture. *First Congress of Molecular Biologist of Serbia (CoMBoS)*. Belgrade 20- 22. IX 2017.
2. **Medar MLJ**, Baburski AZ, Andric SA, Kostic TS (2017) Immobilization stress resets the circadian rhythm of the endocrine function of rat Leydig cells. *First Congress of Molecular Biologist of Serbia (CoMBoS)*. Belgrade 20-22. IX 2017.
3. Andric SA, Radovic SM, Starovlah IM, **Medar MLJ**, Sokanovic SJ, Baburski AZ, Kostic TS (2017) Symphony of molecular adaptation of testosterone-producing Leydig cells. *First Congress of Molecular Biologist of Serbia (CoMBoS)*. Belgrade 20-22.IX 2017.
4. **Medar MLJ**, Baburski AZ, Andric SA, Kostic TS (2017) Stress disturbs Circadian expression pattern of Steroidogenic and Clock genes in Rat Leydig Cells. *Joint meeting of national physiological societies New perspectives in physiological research – young investigator forum*. Subotica, Srbija. 25-27. V 2017.

Комисија констатују да је кандидаткиња Марија Медар на основу резултата добијених експерименталним истраживачким радом на докторској дисертацији објавила један научни рад у часопису категорије M21, као први аутор, те је тим испунила прописане услове за одбрану докторске дисертације. Поред тога, први аутор је три саопштења на међународним скуповима и два саопштења на националним скуповима.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

Резултати добијени кроз различите експерименталне моделе (*in vivo/ex vivo*) у оквиру докторске дисертације указују на глукокортикоидну сигнализацију као важну компоненту обликовања ритма часовника и стероидогене активности Leydig-ових ћелија.

- Глукокортикоиди, као медијатори одговора на стрес, или егзогено примењени, ресетују циркадијални часовник у Leydig-овим ћелијама стимулишући експримирање *Bmal1/BMAL1* и *Per1/PER1* независно од циркадијалног времена али и инхибишући транскрипцију *Reverba* у неактивној фази дана;
- Такође, излагање повећаним нивоима глукокортикоида било изазвано стресом или егзогеном применом, значајно омета производњу тестостерона: Leydig-ове ћелије различито реагују на пораст глукокортикоида изазван стресном ситуацијом у зависности од циркадијалног времена дешавања стресогене ситуације; транскрипција гена кључних за биосинтезу тестостерона (*Lhcgr*, *Star*, *Hsd3b1/2*, *Hsd17b4*) је инхибирана у неактивној фази, а непромењена уколико се стресогена ситуација деси у активној фази дана. Оваква измењена активност стероидогених гена се одражава на ниво тестостерона у циркулацији те је у условима понављане стресне ситуације у активној фази пад тестостерона значајно мањи у односу на стрес у неактивној фази дана. Добијени резултати и дискусија литературних података је указала на координисано деловање глукокортикоидне сигнализације и циркадијалног система у регулацији синтезе тестостерона и обликовању мушке репродуктивне физиологије.

Комисија сматра да су закључци односно резултати истраживања докторске дисертације кандидаткиње Марије Медар у складу са постављеним циљевима, те да су формулисани свеобухватно, систематично, јасно и концизно.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидаткиња је адекватно анализирао, систематизовала у логичне целине, приказала и успешно протумачила резултате истраживања. Свеобухватном и детаљном дискусијом, резултати су објективно и критички упоређени са резултатима других аутора. Изведени закључци дају директне одговоре на постављене циљеве докторске дисертације.

Тестирањем на плагијаризам софтвером iThenticate (<https://www.ithenticate.com/>) утврђен је проценат преклапања од 20%. Увидом у Извештај о тестирању на плагијаризам Комисија констатује да је кандидат адекватно цитирао сву коришћену литературу.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

3. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Комисија оцењује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

4. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Комисија оцењује да докторска дисертација садржи све битне елементе.

5. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Докторска дисертација кандидаткиње Марије Медар је оригиналан допринос науци јер приказује бројне оригиналне научне резултате из области хронобиологије и ћелијске сигнализације Leydig-ових ћелија, као представника ћелија које продукују стероидне хормоне.

Резултати дисертације доприносе разјашњавању улоге глукокортикоида у регулацији ритма ендокрине активности Leydig-ових ћелија. Први пут је показано да пораст глукокортикоида у циркулацији (било да је инициран стрес реакцијом или да су унети у организам) може да делује на

периферни часовник у Leydig-овим ћелијама преко регулације експресије *Bmal1/BMAL1* и *Per1/PER1* али и *Reverba* што има последице и на производњу тестостерона.

Такође, новину представљају сазнања о различитим ефектима стреса на експресију стероидогених гена у зависности од времена дешавања стресне ситуације. Тиме је наглашена улога циркадијалног часовника у синхронизацији ендокрине активности Leydig-ових ћелија. Добијени резултати први пут указују на координисано деловање циркадијалног система и стреса у обликовању мушке репродуктивне физиологије.

На основу свега изнетог, комисија сматра да докторска дисертација поседује све елементе оригиналног научног дела, а добијени резултати су оригинални, те стога докторска дисертација кандидаткиње Марије Медар представља оригиналан допринос науци.

6. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

Комисија оцењује да докторска дисертација нема суштинских недостатака.

X ПРЕДЛОГ:

На основу наведеног, комисија предлаже:

- а) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана;
- б) да се докторска дисертација врати кандидату на дораду (да се допуни односно измени);
- в) да се докторска дисертација одбије.

Место и датум:

Нови Сад, 04.05.2022.

1. др Силвана Андрић, редовни професор

_____, председник

2. др Татјана Костић, редовни професор

_____, члан

3. др Соња Каишаревић, редовни професор

_____, члан

4. др Звездана Којић, редовни професор

_____, члан

5. др Ана Ђорђевић, научни саветник

_____, члан

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.