

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.3.2020. godine, broj 9700/07 - BRP, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Prenatalna hiperandrogenizacija ženki pacova testosteron undekanoatom: kognitivne, elektroencefalografske i metaboličke promene“

kandidata dr Bojane Rankov Petrović, zaposlenoj u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu. Mentor je Prof. dr Aleksandra Rašić Marković, komentor je Prof. dr Đuro Macut.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr OLIVERA STANOJLOVIĆ, predsednik, redovni profesor na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr NELA PUŠKAŠ, vanredni profesor na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. Dr Dragan Hrnčić, docent na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Danijela Vojnović-Milutinović, viši naučni saradnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beograd
5. Prof. dr Sonja Smiljić, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

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 dr Bojane Rankov Petrović napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 110 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 7 tabela, 47 grafikona i 26 slika. Doktorska disertacija sadrži još: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, biografiju doktoranda, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **uvodu** su opisane faze prenatalnog razvoja i polni dimorfizam centralnog nervnog sistema, sa posebnim osvrtom na zone postnatalne neuronske i sinaptogeneze. Na detaljan način je opisana sinteza polnih steroida i neurosteroida, kao i najčešća endokrinopatija reproduktivnog doba kod žena - sindrom policističnih jajnika.

Sa druge strane kroz prizmu anksioznih poremećaja, izneta su dosadašnja saznanja etiološke i patogenetske povezanosti navedenog poremećaja sa polnim hormonima. Opisane su do sada spoznate činjenice o ulozi hormona u polno različitoj percepciji bola i analgeziji.

Opisane su polne razlike u učestalosti i kliničkoj slici epilepsije, kao i u do sada razvijenim različitim animalnim modelima epilepsije.

Kroz uvodna razmatranja na veoma detaljan način opisani su neurotrofini tj. moždani faktor rasta i njegova sinteza u mozgu. Opisan je signalni put i efekti koje prekursor moždanog neurotrofičkog faktora, kao i njegov zreli oblik ostvaruju u mozgu, sa posebnim akcentom na sinapto i neurogenezu. Uzevši u obzir molekularne mehanizme, navedeni su neki od najznačajnijih ispitanih efekata u sferi kognitivnog i psihičkog funkcionisanja, upravo kroz opis dosadašnjih saznanja o adultnoj neurogenezi. Takođe, jasno je akcentovan uticaj polnih hormona na pomenute funkcije.

Bazičnim razjašnjenjem mehanizama oksidativnog stresa i opisom hemijskih efektorata tih reakcija, uvedena je osnova razmatranja moguće etiopatogeneze epileptogenog i anksioznih poremećaja.

Detaljnim prikazom relevantnih informacija, a potom i konciznim opisom poznatih uzročno posledičnih veza polnih hormona i kognitivnih i psihičkih poremećaja u adultnom dobu, uvodnim izlaganjem je postavljena dobra osnova zadatim ciljevima ove doktorske disertacije.

Ciljevi rada su precizno definisani, a sastoje se od ispitivanja uticaja kasne prenatalne androgenizacije testosteron undekanoatom na: antropometrijske karakteristike, karakteristike reproduktivnog fenotipa i građu jajnika adultnih ženskih potomaka; na metaboličke karakteristike, serumsku koncentraciju steroidnih hormona i parametre oksidativnog stresa kod adultnih ženskih potomaka; na parametre anksioznog ponašanja i bolnu osetljivost adultnih ženskih potomaka. Dalji ciljevi su bili i ispitati uticaj prenatalne androgenizacije na bihejvoralne i elektroencefalografske osobine epilepsija izazvanih DL homocistein tiolaktonom kod adultnih ženskih potomaka, te utvrđivanje da li je kasna prenatalna androgenizacija uticala na zastupljenost pojedinih ćelija i neurotrofina u korteksu i hipokampusu adultnih ženskih potomaka, metodom imunohistohemije ili Western blota.

U poglavlju **materijal i metode** je jasno je opisan eksperimentalni protokol u kom su korišćene ženke pacova soja *Wistar* albino, a potom i njihovi ženski potomci. Navedeno je da su životinje nabavljene iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu, i čuvane u polikarbonatnim kavezima, pod standardnim ambijentalnim uslovima za životinje. Sve vreme trajanja eksperimenta voda i hrana su bili dostupni *ad libitum*.

Naznačeno je da su svi eksperimentalni postupci bili u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (86/609/EEC) i odobreni od strane Etičkog komiteta za brigu o životinjama Univerziteta u Beogradu (licenca broj 323-07-06141/2015-05/11).

U cilju ispitivanja efekata prenatalne androgenizacije 20. dana gestacije eksperimentalnoj grupi gravidnih ženki je subkutno administriran komercijalni depo preparat testosteron undekanoata (100mg/kg, s.c.), dok je kontrolnoj grupi majki s.c. administrirano ricinusovo ulje. Drugog postnatalnog dana prebrojan je broj potomaka oba legla, a 21. postnatalnog dana izdvojeni su samo ženski potomci eksperimentalne i kontrolne grupe koji su ušli u dalji tok eksperimenta. Navedeno je da je u daljem toku eksperimenta merena telesna masa i unos hrane, kao i karakteristika reproduktivnog fenotipa. Opisan je metod histomorfološka analiza jajnika kao i način određivanja metaboličkih parametara: glikoze i triglicerida, način izvođenja i merenja intraperitonealnog testa tolerancije na glikozu, koncentracije testosterona, estradiola, progesterona i kortikosterona. Opisan je detaljan metod određivanja parametara oksidativnog stresa u korteksu i hipokampusu. Navedeno je da su za procenu anksioznog ponašanja korišćeni test uzdignutog krstastog lavirinta i otvoreno polje, a za ispitivanje bolne osetljivosti električni von Frey esteziometar. U ovoj disertaciji je korišćen je ranije postavljen model konvulzivnog ponašanja iz iste laboratorije, koji je i sada precizno opisan. Precizno je opisana i Western blot tehnika određivanja nivoa proBDNF i BDNF proteina u dorzolateralnom frontalnom korteksu i hipokampusu. Imunohistohemijskim bojenjem učinjena je kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija: imunoreaktivnih ćelija u proliferaciji (Ki67), neurona (NeuN), interneurona (PV, NPY) i glije (GFAP) u hipokampusima ispitivanih životinja.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljani 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 310 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da prenatalna androgenizacija ženki pacova u 20. danu gestacije smanjuje telesnu masu na rođenju, ali povećava telesnu masu u adultnom dobu.

Prenatalni tretman testosteronom uticao je na smanjeno postnatalno preživljavanje potomaka, ali nije uticao na reproduktivnih fenotip i građu jajnika. Rezultati ispitivanja metaboličkih parametara ukazali su da je serumski nivo triglicerida bio značajno veći, dok je intraperitonealni test tolerancije na glikozu pokazao značajno više vrednosti u eksperimentalnoj grupi životinja.

Prenatalna androgenizacija je smanjila koncentraciju serumskog kortikosterona, ali nije uticala na koncentracije testosterona, estradiola i progesterona u serumu.

Antioksidativni enzimi superoksid-dizmutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GPx) bili su značajno povišeni u obe ispitivane strukture u eksperimentalnoj grupi životinja.

Kvantifikacijom parametara ponašanja u uzdignutom plus lavirintu i otvorenom polju uočeno je anksioznosti slično ponašanje kod životinja eksperimentalne grupe.

Primenjeni testosteron u prenatalnom periodu nije imao uticaj na bolnu osetljivost kod odraslih ženskih potomaka.

Prenatalni tretman testosteronom je ispoljio prokonvulzivno i proepileptičko dejstvo na modelu homocisteinske epilepsije kod adultnih ženskih potomaka.

Ekspresija prekursora (eng. brain derived neurotrophic factor, proBDNF) i zrelog moždanog neurotrofičkog faktora rasta (mBDNF) bila je povećana u hipokampusu, dok je u korteksu bila povećana ekspresija mBDNF.

Prenatalna androgenizacije je uticala na smanjenje markera proliferacije (Ki67) u dentatnom girusu, NPY i PV imunoreaktivnih ćelija u CA1 regiji hipokampusa u poređenju sa kontrolom. Ekspresija NeuN te broj neurona bili su značajno veća u CA1 regiji hipokampusa u poređenju sa kontrolom. Prenatalna androgenizacije nije uticala na ekspresiju GFAP + ćelija dentatnog girusa hipokampusa.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prenatalna androgenizacija predstavlja jedan od najboljih animalnih modela koji omogućava istraživanje fetalnog programiranja i njegove efekte u odrasloj dobi (Padmanabhan i sar., 2010; Nisenblat i sar., 2010). Hiperandrogenizacija je jedna od karakteristika obolelih od PCOS, a predstavlja jedno od najčešćih reproduktivnih oboljenja današnjice, sa prevalencom od 8 do 12% kod žena reproduktivne dobi (Franks, 2003). Etiologija poremećaja je još uvek nerazvijena, ali savremene teorije ukazuju na postojanje genetskih i intrauterinih uzroka (McCartney i Marshall, 2016).

U okvirima naših saznanja i dostupne literature, ovo istraživanje je prvo u kome je korišćen testosteron undekanoat koji je administriran 20. gestacijskog u cilju izazivanja hormonskih karakteristika PCOSa – hiperandrogenizma majke tokom gestacije. U cilju razvoja prenatalnog modela PCOS kod pacova, veliki broj istraživača je zaključio je da je adekvatan period administracije testosterona od 16 do 19 dana gestacije: post-placentalno vreme kao i vreme tokom kojeg androgeni imaju ulogu neuromodulatora (Amalfi i sar., 2012). Ipak, uočeno je da se skok koncentracije androgena kod muških fetusa pacova događa od 16. do 21. gestacionog dana, te da primenjena doza androgena tokom ovog perioda može biti presudna za modulaciju ženskog ponašanja. Koncentracije metaboličkih parametara u androgenizovanih životinja bile su značajno veće u poređenju sa kontrolnom grupom: koncentracija triglicerida i intraperiotnealni test tolerancije na glikozu. Pretpostavlja se da osovina: androgeni-mozak-adipociti posreduje u metaboličkoj disfunkciji tokom PCOSa (Villanueva i sar., 2008). Najprominentniji metabolički poremećaji koji predstavljaju deo sindroma PCOS su hiperinsulinemija, insulinska rezistencija, diabetes tip 2, povećana telesna masa, oligo/anovulacija, poremećaj hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine i drugi (Foecking, 2005; Wu i sar., 2010). Prenatalnom administracijom androgena, omogućeni su analozi PCOS i metaboličkog sindroma pored odraslih pacova, kod majmuna (Abbott i sar., 2005) i kod ovaca (Manikkam i sar., 2006; Christine Knickmeyer i sar., 2006). Kasna prenatalna primena testosterona nije značajno izmenila reproduktivni fenotip, iako su učene diskretne promene u estrusnom ciklusu. Visok nivo testosterona u prenatalnom periodu utiče na razvoj defeminizacije mehanizmom frekventnije pulsne sekrecije gonadotropin-oslobađajućeg hormona (eng. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) (Foecking EM, 2005). Rezultati ove studije su pokazali da kasna prenatalna primena testosterona nije značajno uticala koncentracije testosterona, estradiola i progesterona kod adultnih ženskih potomaka. Ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjem Domonkos i saradnika (2017) koji su pokazali da primena

testosteron propionata od 18.-21. dana gestacije nije značajno izmenila serumsku koncentraciju testosterona, estradiola i progesterona. Primarni efekat PCOS epigenetskog otiska ogleda se u promeni kodiranja gena za estrogenski receptor α (ESR1). Pretpostavlja se da ushodna regulacija ESR1 *in utero* može biti osnova razvoja metaboličkog sindroma i disfunkcije koja se događa od perioda polnog sazrevanja do odraslog doba. Signalna kaskada koju indukuje aktivacija ESR1 aktivira u daljem toku fosfo inozitol 3 kinazu koja uzrokuje poremećaj oksido-reduktivnog lanca i insulinsku rezistenciju aktivacijom narednog signalnog puta (Yang i sar., 2014).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da hiperandrogenemija u gestacionom periodu indukuje anksiozno ponašanje kod adultnih ženskih potomaka. Ipak, rezultati drugih istraživača po ovom pitanju su inkonzistentni. Veća prevalenca anksioznosti kod žena i hipogonadnih muškaraca u poređenju sa zdravim muškarcima ukazuje na anksiolitički efekat androgena (Stevens i Hamann, 2013). Ovo je potvrđeno eksperimentalnim studijama, gde je nakon administracije testosterona uočeno smanjenje anksioznog ponašanja kod orhiektomisanih mužjaka pacova i miševa (Bing i sar., 1998; Aikej i sar., 2002). Nasuprot orhiektomisanim mužjacima pacova, primjena fiziološka doza testosterona kod ovariektomisanih ženki pacova, nije imala uticaja na anksiozno ponašanje (Carrier i Kabbaj, 2012). Iako je hiperandrogenemija najistaknutija metabolička karakteristika PCOSa, navodi se da skoro 60% žena sa PCOSom ima dijagnostikovani najmanje jedan psihijatrijski poremećaj kao što su anksioznost, depresija ili poremećaj ishrane (Krepula i sar., 2012).

Kasna prenatalna androgenizacija majki u ovoj studiji izazvala je smanjenje broja NPY+ i PV+interneurona u CA1 regionu hipokampusa. Ovo je u skladu sa istraživanjem Joksimovića i saradnika (2017) koji su takođe uočili značajno smanjenje broja NPY+ interneurona posle tretmana sintetskim androgenom - nandrolon dekanoatom, što je u bihevioralnom smislu pozitivno koreliralo sa anksioznom i depresivnim ponašanjem. Studije na glodarima pružile su brojne dokaze koji dokazuju vezu između NPY i PV interneurona i anksioznosti. Optogenetske studije su dokazale značaj GABAergičke, a posebno parvalbuminske interneuronske aktivnosti u hipokampusu u smanjenju anksioznosti (Pelkey i sar., 2017).

Rezultati studije pokazuju da prenatalna hiperandrogenizacija snižava konvulzivni prag u prenatalno androgenizovanih ženskih potomaka u homocisteinskom modelu epilepsija. Jedan od mehanizama povećane podložnosti napadima izazvanim homocisteinom nakon prenatalne androgenizacije mogla bi biti stimulacija hipokampalne neurogeneze. Proliferativna aktivnost (Ki67+) u subgranularnoj zoni DG hipokampusa nije bila značajno izmenjena iako je pokazivala trend smanjenja u TU grupi. U eksperimentalnoj grupi registrovana je povećana NeuN imunoreaktivnost u dentatnom girusu hipokampusa, koja je odraz broja zrelih neurona. Imajući u vidu da prenatalni tretman nije uticao na koncentracije testosterona i estrogena u serumu (Rankov Petrović i sar., 2019), nalaz povećanog broja neurona može biti posledica ontogenetskih uticaja koji su posledica prenatalne androgenemije. Nalazi Iyengar i sar. (2015) su pokazali da primena kainatne kiseline indukuje napade jačeg intenziteta kod miševa sa smanjenom adultnom neurogenezom. Ova pojava se može objasniti osobinom nezrelih GABA neurona da na stimulus reaguju depolarizacijom, a ne hiperpolarizacijom kao što je to slučaj sa zrelim neuronima (Karten i sar., 2006; Marin-Burgin i sar., 2012; Markvardt i Overstreet-Wadiche, 2008).

Ova studija je pokazala region specifično povećanje ekspresije proBDNF i mBDNF proteina, uz istovremeno smanjenje ćelijske proliferacije u DG (Ki67), smanjenu ekspresiju inhibicijskih PV+ i NPY+ interneurona, dok broj NeuN imunoreaktivnih neurona bio povećan a

ekspresija GFAP imunoreaktivnih ćelija glijne u hipokampusu, a u odnosu na kontrolu. BDNF indukuje diferencijaciju neuralnih progenitorskih ćelija u ekscitatorne granularne neurone u dentatnom girusu, ali i na inhibicijske. S toga nalaz povećane ekspresije pro- i mBDNF proteina može korelirati sa nadjenim rezultatom povećanog broja NeuN u hipokampusu.

Iako je uloga oksidativnog stresa u epileptogenezi dobro poznata (Silvestri i sar., 1992; Pauletti i dr., 2017), prokonvulzivni uticaj prenatalne androgenizacije u modelu epilepsija izazvanih DL homocistein tiolaktonom, ne može se direktno pripisati oksidativnom stresu u mozgu. Peroksidacija lipida, nitracija tirozina i koncentracija tiolnih grupa nisu bile izmenjene nakon prenatalne izloženosti testosteronu. Nasuprot tome, ova studija je otkrila da prenatalna androgenizacija poboljšava antioksidativni kapacitet korteksa i hipokampusa, usled povećanog nivoa aktivnosti glutation peroksidaze i superoksid dizmutaze. Ovi nalazi su verovatno multifaktorskog porekla. Mehanizmi delovanja testosterona na oksidativni status mozga još uvek nisu razjašnjeni. Pojačana sekrecija testosterona koja pozitivno korelira sa reproduktivnim ponašanjem kod mužjaka pacova, povećava peroksidaciju lipida u mozgu i indukuje nitrozativno oštećenja tokom starenja (Alabarse i sar., 2011). Međutim, ovaj nalaz povezan je sa povećanom aktivnošću GPx-a i SOD-a. Zanimljivost je da aktivnost GPx i SOD raste pre peroksidacije lipida (Alabarse i sur., 2011), od 3 meseca starosti. Budući da su kroz istraživanje testirane životinje približno iste starosti, to može sugerisati da prenatalna androgenizacija potencijalno utiče na peroksidaciju lipida kasnije u životu, ali najpre vrši ushodnu regulaciju antioksidantnih enzima GPx i SOD. Pored toga, imajući u vidu da su u ovom istraživanju korišćene ženke pacova, estrogeni sa svojim moćnim antioksidativnim efektom mogu sprečavati lipidnu peroksidaciju u mozgu.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Rankov Petrovic B, Hrcic D, Mladenovic D, Simic T, Suvakov S, Jovanovic D, Puskas N, Zaletel I, Velimirovic M, Cirkovic V, Macut D, Stanojlovic O, Rasic-Markovic A. **Prenatal Androgenization Induces Anxiety-Like Behavior in Female Rats, Associated with Reduction of Inhibitory Interneurons and Increased BDNF in Hippocampus and Cortex.** Biomed Res Int. 2019 Jun 10;2019:3426092. doi: 10.1155/2019/3426092. PMID: 31281833; PMCID: PMC6590533.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Prenatalna hiperandrogenizacija ženki pacova testosteron undekanoatom: kognitivne, elektroencefalografske i metaboličke promene“ dr Bojane Rankov Petrović, predstavlja prvu ovakvu studiju prenatalne androgenizacije i predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja hormonskog disbalansa u prenatalnom periodu i njegovih dugoročnih posledica u odraslom dobu kako na metabolizam tako i na strukturne i funkcionalne promene u centralnom nervnom sistemu. Ove promene se potom odražavaju na kognitivno i psihičko funkcionisanje jedinke.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila 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 Bojane Rankov Petrović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 08.06.2020.

Članovi Komisije:

Prof. dr Olivera Stanojlović

Prof. dr Nela Puškaš

Doc. dr Dragan Hrnčić

VNS dr Danijela Vojinović Milutinović

Prof. dr Sonja Smiljić

Mentor:

Prof. Dr Aleksandra Rašić Marković

Komentor:

Prof. Dr Đuro Macut
