

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.06.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Небојше Андрића и др Небојше Јаснића о урађеној докторској дисертацији Драгане Самарције Ненадов (девојачко Самарција), истраживача-сарадника на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду под насловом „Утицај атразина и бисфенола А на функцију гранулоза ћелија оваријума пацова“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Небојша Андрић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, др Небојша Јаснић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелена Ђорђевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Кристина Погрмић Мајкић, научни сарадник Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација под насловом „Утицај атразина и бисфенола А на функцију гранулоза ћелија оваријума пацова“ написана је на српском језику (латиничним писмом) на 122 стране и садржи 32 графичка прилога, 1 табелу и 203 цитираних литературних навода. Дисертација је подељена на следећа поглавља: 1. Увод (29 страна), 2. Циљеви истраживања (2 стране), 3. Материјал и методе (21 страна), 4. Резултати (28 страна), 5. Дискусија (13 страна), 6. Закључак (2 стране) и 7. Литература (20 страна). На почетку докторске дисертације се налази насловна страна на српском и енглеском језику, затим страна са информацијама о менторима и члановима Комисије, списак радова у којима се налазе резултати докторске дисертације, захвалница, сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, научном области и ужом научном области којој докторска дисертација припада. Затим следи садржај докторске дисертације. На крају докторске дисертације налази се биографија кандидата и изјаве.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** дат је приказ савремених сазнања о гранулоза ћелијама, као и о два ендокрина ометача, атразину и бисфенолу А, са посебним освртом на ефекте атразина и бисфенола А на функцију женског репродуктивног система. Први део увода је посвећен оваријумској стероидогенези са приказом пута биосинтезе естрадиола и прогестерона у гранулоза ћелијама. Даље је кандидаткиња детаљно приказала сигналне путеве у гранулоза ћелијама који се активирају под дејством фоликулостимулишућег и лутеинизирајућег хормона. Приказ функције оваријума завршава се сазнањима о овулацији. Затим следи део о ендокриним ометачима, дефиниција појма ендокрини ометачи и могућа класификација ових хемикалија, кратак преглед путева преко којих људски организам може бити изложен овим хемикалијама и могућих ефеката на здравље људи. Поред тога, приказани су до сада описани механизми деловања ендокриних ометача. Након општег дела о ендокриним ометачима, кандидаткиња је представила атразин, а затим и бисфенол А, два ендокрина ометача који су предмет истраживања ове докторске дисертације. Дати су подаци о физичко-хемијским особинама атразина и бисфенола А, концентрацији ових хемикалија у животној средини, метаболизму, као и биолошким ефектима код различитих организама,

укључујући и сазнања добијена из епидемиолошких студија. Посебна пажња у уводу је посвећена ефектима атразина и бисфенола А на женски репродуктивни систем. У овом делу дат је детаљан преглед сазнања о токсичном деловању атразина и бисфенола А на репродуктивну функцију оваријума, укључујући преглед доза које остварују ефекте након *in vivo* и *in vitro* третмана. У овом делу представљена су и досадашња сазнања о механизмима преко којих ова два ендокрина ометача испољавају негативне ефекте на гранулоза ћелије.

У поглављу **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА** сажето су дефинисани следећи циљеви истраживања: испитивање ефеката и механизма дејства атразина на незреле гранулоза ћелије у *in vitro* условима, као и током *in vivo* третмана незрелих женки пацова са гонадотропинима; испитивање ефеката и механизма дејства бисфенола А на незреле гранулоза ћелије у *in vitro* условима.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описани су експериментални протоколи који су коришћени током *in vitro* третмана незрелих гранулоза ћелија са атразином и бисфенолом А, односно током *in vivo* огледа са атразином. За *in vitro* експерименте гранулоза ћелије су изоловане из 21-24 дана старих женки пацова и након сађења ћелије су третиране атразином и бисфенолом А у одсуству или током стимулације гонадотропним хормонима у трајању од 24 h или 48 h. За *in vivo* огледе, незреле женке пацова старе између 21-24 дана су интраперитонеално примале атразин током стимулације животиња гонадотропним хормонима у трајању од два или три дана. Прецизно су наведене специфичне и неспецифичне хемикалије, врста експерименталних животиња, секвенце гена, врсте и порекло антитета и уређаји који су коришћени у експерименталном раду. Мерење нивоа естрадиола и прогестерона у медијуму и серуму, односно цикличног аденозин монофосфата (*енгл.* cyclic adenosine monophosphate, cAMP) у медијуму урађено је радиоимунолошком или ELISA (*енгл.* enzyme linked immunosorbent assay) методом. Мерени су нивои експресије гена (нивои иРНК или протеина) за ароматазу, стероидогени акутни регулаторни протеин (*енгл.* steroidogenic acute regulatory protein, StAR), дезмолазу, 3 β -хидроксистероид дехидрогенезу (*енгл.* 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -HSD), рецептор за лутеинизирајући хормон (*енгл.* luteinizing hormone receptor, LHR), амфирегулин (*енгл.* amphireguline, AREG), епирегулин (*енгл.* epireguline, EREG) и прогестеронски рецептор (*енгл.* progesterone receptor, PGR), C/EBP β (*енгл.*, CCAAT-enhancer-binding protein), P450 фамилију 1B1 (*енгл.* cytochrome P450 1B1, CYP1B1), АБЦ транспортер 1 (*енгл.* ATP-binding cassette transporter 1, ABCA1), SREBP-1 (*енгл.* sterol regulatory element binding protein) у ћелијама коришћењем ланчане реакције полимеразе у реалном времену (RT-PCR) и Western blot методе. Анализа фосфорилације CREB (*енгл.*, cAMP response element-binding protein), протеин киназе Б, односно Акт (*енгл.* protein kinase B, PKB или Akt) је рађена Western blot методом, док је активација ванћелијским сигнаlima регулисаних киназа 1 и 2 (*енгл.* extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2) анализирана ELISA методом на гранулоза ћелијама у култури. За детекцију холестерола у ћелијама коришћена је Филипин боја. Резултати експеримената су статистички анализирани коришћењем т-теста, односно анализом варијанси са два фактора (*Two-way ANOVA*) коришћењем *Dunnnett* или *Tukey post hoc* теста.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** логички прати експериментални дизајн и такође је подељено на три потпоглавља. У првом потпоглављу приказани су резултати деловања атразина на незреле гранулоза ћелије у *in vitro* условима. Показано је да атразин спречава синтезу естрадиола, док потенцира продукцију прогестерона код гранулоза ћелија које су стимулисане фоликулостимулишућим хормоном. Атразин смањује и релативну експресију гена за ароматазу, ензим који учествује у стварању естрадиола, као и гена за LHR, неопходног за процесе овулације, док повећава релативну експресију гена за StAR и дезмолазу код ћелија стимулисаних са фоликулостимулишућим хормоном. Смањена експресија рецептора за LHR код ћелија третираних са атразином и

фоликулостимулишућим хормоном затим спречава хумани хорионски гонадотропин да индукује релативну експресију гена за протеине који учествују у регулацији овулације, као што су AREG, EREG и PGR. У резултатима ове докторске дисертације показан је по први пут могући механизам деловања атразина на синтезу естрадиола и прогестерона код гранулоза ћелија стимулираних са фоликулостимулишућим хормоном. Коришћењем фармаколошких инхибитора сигналних путева и праћењем фосфорилације појединих сигналних молекула, показано је следеће: (1) атразин модификује сигнални пут cAMP преко инхибиције фосфодиестераза код гранулоза ћелија третираних са фоликулостимулишућим хормоном. Промене у овом путу утичу на повећање фосфорилације CREB и Akt протеина и на повећање експресије C/EBP β протеина. Међутим, није запажен повећан ниво фосфорилације ERK1/2 након третмана атразином, иако је инхибитор ове киназе поништио ефекте атразина на стероидогенезу код гранулоза ћелија третираних са фоликулостимулишућим хормоном; (2) атразин повећава експресију ензима CYP1B1. Овај ензим има значајну улогу у катаболизму естрадиола, те заједно са смањењем нивоа ароматазе код ћелија третираних са атразином и фоликулостимулишућим хормоном доприниси ниском нивоу овог стероида. Друго потпоглавље у резултатима приказује *in vivo* ефекте атразина на гранулоза ћелије пацова. По први пут је показано да атразин спречава овулацију стимулисану гонадотропинима. Овај ефекат атразина се објашњава смањењем релативне експресије гена за LHR, што даље доводи до смањене експресије гена који кодирају протеине који регулишу процес овулације, укључујући AREG, EREG и PGR након стимулације са овулационом дозом хуманог хорионског гонадотропина. Атразин такође доводи и до смањења нивоа естрадиола у серуму и смањења релативне експресије гена за ароматазу код пацова третираних са коњским хорионским гонадотропином. Као један од разлога за низак ниво естрадиола у серуму током *in vivo* третмана пацова атразином се наводи повећање релативне експресије гена за CYP1B1 ензим у оваријумима пацова. У трећем потпоглављу кандидаткиња је приказала резултате испитивања ефеката бисфенола А на незреле гранулоза ћелије пацова у *in vitro* условима. Показано је да бисфенол А доводи до смањене синтезе прогестерона како у нестимулисаним, тако и у гранулоза ћелијама стимулираним фоликулостимулишућим хормоном, иако је експресија гена који кодирају протеине задужене за синтезу прогестерона као што су StAR, дезмолаза и 3 β -HSD повећана код гранулоза ћелија третираних са бисфенолом А. У резултатима је даље представљен потенцијални механизам који доводи до негативног ефекта бисфенола А на прогестерон. Коришћењем боје Филипин, која се везује за слободни холестерол у ћелијама, показана је секвестрација холестерола у перинуклеусном простору. Поред већ показаног повећања експресије протеина, који учествује у транспорту холестерола у митохондрије (StAR), резултати су показали да бисфенол А смањује релативну експресију гена за ABCA1 који учествује у реверзном транспорту холестерола у ћелијама, као и да повећава ниво протеина одговорног за биосинтезу холестерола (SREBP-1). Додавањем холестерола делимично је спречен негативан ефекат бисфенола А на ниво прогестерона, као и на реалативну експресију гена који кодирају протеине укључене у метаболизам холестерола.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** организовано је у три потпоглавља тако да у највећој мери прати начин приказа резултата. Резултати истраживања су објашњени и сагледани у светлу релевантних литературних података и поређени са резултатима других истраживања из дате области. Кандидаткиња је показала изузетно добро познавање проблематике истраживања, критичку моћ и способност сагледавања резултата са различитих аспеката. У првом потпоглављу кандидаткиња дискутује добијене резултате о *in vitro* ефектима атразина на пут биосинтезе естрадиола и прогестерона код гранулоза ћелија стимулираних са фоликулостимулишућим хормоном. Резултати ових испитивања показују да овај ендокрини ометач остварује свој негативан ефекат приликом синергистичког деловања са природним хормоном. Посебно је истакнута веза измеђи атразина и појаве превремене

лутенизације, односно смањеног овулационог капацитета гранулоза ћелија, што указује да овај ендокрини ометач показује потенцијал да доведе до обољења оваријума и неплодности. Поред тога, детаљно су анализирани промене у сигналним путевима који контролишу стероидогенезу код гранулоза ћелија третираних са атразином и фоликулостимулишућим хормоном. У другом потпоглављу кандидаткиња дискутује резултате везане за *in vivo* примену атразина код гонадотропинима стимулираних незрелих женки пацова. Ова истраживања значајно допуњују *in vitro* експерименте, дајући комплетнију слику о деловању атразина на гранулоза ћелије. Поред дискусије резултата о ефектима атразина на овулацију и стероидогенезу током *in vivo* третмана, обрађују се и механизми преко којих атразин остварује свој ефекат, при чему је посебан акценат стављен на улогу ензима који учествују у метаболизму хемикалија. У трећем потпоглављу, дискутују се резултати везани за *in vitro* ефекат другог ендокриног ометача, бисфенола А, на пут биосинтезе прогестерона код незрелих гранулоза ћелије. Посебно су обрађени резултати везани за хомеостазу холестерола где кандидаткиња дискутује везу између поремећаја у хомеостазу холестерола и смањења стварања прогестерона код гранулоза ћелија третираних са бисфенолом А. На крају, кандидаткиња даје критички осврт на концентрације атразина и бисфенола А које су коришћене у овој дисертацији, поредећи их са сличним студијама, и дајући препоруке за могуће правце даљих истраживања.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно су сумирани следећи закључци истраживања: *In vitro* третман атразином негативно утиче на стероидогенезу у гранулоза ћелијама стимулираним са фоликулостимулишућим хормоном, што се огледа у спречавању синтезе естрадиола и повећању стварања прогестерона. Промене у синтези ова два стероидна хормона су последица смањења релативне експресије гена који учествују у синтези естрадиола (ароматаза), односно, повећања релативне експресије гена који кодирају протеине укључене у пут биосинтезе прогестерона (StAR и дезмолаза). Дисбаланс у стварању стероидних хормона указује на процес превремене лутенизације. Атразин негативно делује на овулациони капацитет гранулоза ћелија, тако што смањује релативну експресију гена за LHR код ћелија стимулираних фоликулостимулишућим хормоном и тиме спречава хумани хорионски гонадотропин да индукује експресију гена укључених у контролу процеса овулације. Ефекат на пут биосинтезе естрадиола и прогестерона, као и на релативну експресију гена за LHR, атразин остварује преко активације cAMP, ERK1/2 и Akt сигналних путева и повећања релативне експресије гена за CYP11B1. *In vivo* третман атразином незрелих женки пацова стимулираних гонадотропинима довео је до потпуне блокаде овулације, што је последица инхибиторног деловања атразина на релативну експресију гена за LHR, која онемогућава хумани хорионски гонадотропин да индукује експресију гена укључених у контролу процеса овулације, AREG и EREG. Смањена релативна експресија гена за LHR код незрелих женки пацова третираних са атразином последица је смањеног нивоа естрадиола која се јавља као резултат поремећаја у метаболизму овог стероида: смањења синтезе естрадиола (инхибиција релативне експресије гена за ароматазу), као и повећања катаболизма естрадиола (стимулација релативне експресије гена за CYP11B1). *In vitro* третман са бисфенолом А негативно утиче на пут биосинтезе прогестерона у незрелим гранулоза ћелијама, што се огледа у смањењу продукције прогестерона у базалним условима, као и након стимулације са фоликулостимулишућим хормоном, али и повећању релативне експресије гена за StAR, дезмолазу и 3 β -HSD. Смањено стварање прогестерона након третмана гранулоза ћелија са бисфенолом А је последица поремећаја у хомеостазу холестерола, што је резултат секвестрације холестерола у перинуклеусном простору, а огледа се у смањеној релативној експресији гена за ABCA1 (укљученог у ефлукс холестерола), повећаној експресији StAR (укљученог у транспорт холестерола) и SREBP-1 протеина (укљученог у синтезу холестерола).

Поглавље ЛИТЕРАТУРА садржи 205 библиографских јединица које су једнообразно приказане и адекватно цитиране у тексту дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Fa S., Pogrmic-Majkic K., Samardzija D., Glisic B., Kaisarevic S., Kovacevic R., Andric N. (2013) Involvement of ERK1/2 signaling pathway in atrazine action on FSH-stimulated LHR and CYP19A1 expression in rat granulosa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 270(1):1-8 (M21).
2. Pogrmic-Majkic K., Samardzija D., Fa S., Hrubik J., Glisic B., Kaisarevic S., Andric N. (2014) Atrazine enhances progesterone production through activation of multiple signaling pathways in FSH-stimulated rat granulosa cells: evidence for premature luteinization. *Biology of Reproduction*, 91(5);124:1-10 (M21).
3. Samardzija D., Pogrmic-Majkic K., Fa S., Glisic B., Stanic B., Andric N. (2016) Atrazine blocks ovulation via suppression of Lhr and Cyp19a1 mRNA and estradiol secretion in immature gonadotropin-treated rats. *Reproductive Toxicology*, 61:10-8 (M21).

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Samardzija D., Gasic S., Pogrmic-Majkic K., Fa S., Andric N. Atrazine elicits ovulatory blockade in gonadotropin-primed rats without affecting luteinization. 4th Young Environmental Scientist Meeting, Istrazivacki centar Petnica, Srbija, 14.-19. Mart 2015., knjiga apstrakata str. 51, usmeno izlaganje. (M34)
2. Samardzija D., Pogrmic-Majkic K., Fa S., Kovacevic R., Andric N. Decrease in Luteinizing Hormone Receptor Expression by Atrazine Elicits Ovulatory Blockade in Gonadotropin-Primed Rats. 11th Serbian Congress Of Toxicology "New Frontiers And Challenges In Toxicology", Sremski Karlovci, Srbija, 24.-27. jun 2014., knjiga apstrakata str. 128-129, poster br. PP-2. (M34)
3. Pogrmic-Majkic K., Samardzija D., Fa S., Kovacevic R., Andric N. Atrazine Provokes Premature Luteinization of Granulosa Cells Through Activation of Multiple Signaling Pathways *in vitro*. 11th Serbian Congress Of Toxicology "New Frontiers And Challenges In Toxicology", Sremski Karlovci, Srbija, 24.-27. jun 2014., knjiga apstrakata str. 134-135, poster br. PP-5. (M34)

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију Драгане Самарције Ненадов (девојачко Самарција) закључујемо да је дисертација у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме. Дисертација је израђена у складу са принципима научно-истраживачког рада и садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Постављени циљеви истраживања су успешно реализовани. Добијени резултати су прегледни и јасно критички дискутовани. Комисија сматра да су резултати приказани у овој докторској дисертацији оригинално научно дело и да представљају значајан допринос у расветљавању не само ефеката него и механизма деловања атразина и бисфенола А на гранулоза ћелије. Ово мишљење Комисије потврђује квалитет часописа у којима су објављени резултати докторске дисертације кандидаткиње Драгане Самарције Ненадов (девојачко Самарција). Истраживања у оквиру ове докторске дисертације реализована су делом од средстава са међународног пројекта финансираног од стране Европске Комисије из позива ФП7 – *Environmental Signaling and Ovarian Diseases Susceptibility #321745 (2012-2016)*, а делом од средстава са пројекта Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије ОИ 173037.

На основу укупне оцене дисертације, увида у истраживачки рад кандидата, и сагласно свим претходно изнетим чињеницама у овом Извештају, Комисија предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „**Утицај атразина и бисфенола А на функцију гранулоза ћелија оваријума пацова**“ кандидата Драгане Самарције Ненадов (девојачко Самарција) прихвати, а кандидату одобри одбрана докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

др Небојша Андрић, доцент
Природно-математички факултет, Универзитет у
Новом Саду

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

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

др Кристина Погрмић-Мајкић, научни сарадник
Природно-математички факултет, Универзитет у
Новом Саду

У Београду, 07.07.2017. године