

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.05.2018. године, прихваћен је извештај ментора ред. проф. др Силване Андрић и ван. проф. др Небојше Јаснића о урађеној докторској дисертацији *Маје М Србован (рођене Бјелић)*, под насловом **“Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

- (1) др Силвана Андрић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
- (2) др Татјана Костић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
- (3) др Небојша Јаснић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет,
- (4) др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет,

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Текст докторске дисертације Маје М (рођене Бјелић) Србован под насловом **“Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида”**, има 139 страна и подељен је у 7 поглавља: Увод (36 страна), Циљеви истраживања (3 стране), Материјал и методе (23 стране), Резултати (29 страна), Дискусија (19 страна), Закључци (4 стране) и Литература (20 страна). Дисертација садржи 28 слика (увод: 4, материјал и методе: 4, резултати: 15, дискусија: 5), 6 табела (материјал и методе: 5, резултати: 1) и 211 литературних навода, као и Сажетак, Биографију и Прилоге.

Експериментални део докторске дисертације урађен је у Лабораторији за репродуктивну ендокринологију и сигналинг (<https://www.dbe.uns.ac.rs/en/nauka-eng/lares>), Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду.

Анализа докторске дисертације:

I поглавље: УВОД (36 страна и 4 слике) је подељен у 2 целине:

2.1. Функционална организација тестиса

Описана је комплексност функционалне организације тестиса, са посебним освртом на интерстицијумски одељак тестиса у коме се, поред осталих ћелија, налазе и Лајдигове ћелије изложене бројним јукстакриним и паракриним факторима из интерстицијумске течности тестиса. Дат је детаљан преглед функционалних карактеристика Лајдигових ћелија, значај мембранског потенцијала митохондрија и енергетског статуса митохондрија. Детаљно је описан процес биосинтезе тестостерона тј. стероидогенезе у Лајдиговим ћелијама, са посебним освртом на изворе и мобилизацију холестерола. Наведени су и описани сви елементи тзв. стероидогене машинерије која подразумева ензиме који учествују у стероидогенези (стероидогени ензими), транскрипционе факторе и кофакторе, као и све остале важне регулаторе биосинтезе тестостерона. Детаљно су описани сви начини регулације функционалности Лајдигових ћелија (ендокрини, паракрини, аутокрини, криптокрини, јукстакрини) и дат је систематичан приказ главних сигналних путева укључених у регулацију функције Лајдигових ћелија.

2.2. Биолошки ефекти анаболичких андрогених стероида – примена и злоупотреба

У тексту је дат појам појам андрогених анаболичких стероида (ААС), као синтетисаних деривата андрогена чија се примена у клиници заснива на дејству које остварују посредством андрогених и/или анаболичких ефеката у циљу третирања бројних клиничких поремећаја, као и у сврхе контрацепције. Објашњен је начин и значајан ниво злоупотребе ААС, не само од стране професионалних и рекреативних спортиста, него и велике популације адолесцената, иако је добро познато да њихова употреба у нетерапеутске сврхе може изазвати низ нежељених здравствених последица. Поред тога, документовано је велико интересовање научне заједнице и потреба за разјашњавањем прецизних молекулских догађаја, који су последица краткорочне и дугорочне примене ААС.

II поглавље: ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (3 стране)

Дат је кратак увод о потреби и значају истраживања функционалности и образаца сигналних путева Лајдигових ћелија након примене ААС. Дефинисан је главни циљ рада, као и два специфична циља рада.

Главни циљ рада био је да испита функционалност и обрасце сигналних путева важних за одржавање стероидогене функције Лајдигових ћелија одраслих пацова, нарушених применом егзогених агониста и/или антагониста тестостерона, у *in vivo* и *in vitro* условима. Специфичним циљевима рада дефинисани су параметри који су пратили испитивање:

(I) ефеката краткорочне и дугорочне системске *in vivo* примене најчешће употребљаваног и злоупотребљаваног ААС, тестостерон-енантата (ТЕ), на стероидогену функцију Лајдигових ћелија одраслих пацова, као и образац експресије елемената сАМР-PRКА сигналног пута, као главног регулатора процеса стероидогенезе.

(2) улоге андрогеног рецептора (AR) у ефектима тестостерона, применом блокатора за ове рецепторе у *in vivo* (Андрокур, А) или *in vitro* (ципротерон-ацетат, CPA) условима.

III поглавље: МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ (23 стране, 4 слике, 5 табела)

Текст поглавља садржи информације о хемикалијама коришћеним у раду, условима гајења експерименталних животиња, описе *in vivo* експерименталних модела, а фазе експерименталних поступака су сумиране у одговарајућим шематским приказима. Описане су методе коришћене за одређивања биохемијских и физиолошких параметара (релативна експресија гена, протеина, функционалност рецептора и ензима, ниво хормона у циркулацији, секундарних гласника у ћелијама итд). Примењене методе су поуздане и адекватне за остваривање описаних експерименталних поставки и циљева истраживања.

Квантитативно изражено, праћено је 13 функционалних параметара:

- (1) Концентрација LH у серуму.
- (2) Концентрација андрогена (Т+DHT) у серуму.
- (3) Запремина интерстицијумске течности тестиса (TIF).
- (4) Концентрација андрогена (Т+DHT) у TIF-у.
- (5) Концентрација андрогена (Т+DHT) у комадићу тестиса пре одвајања TIF-а.
- (6) Концентрација андрогена (Т+DHT) у комадићу тестиса после одвајања TIF-а.
- (7) Концентрација андрогена (Т+DHT) у медијуму у коме су инкубиране ћелије
- (8) Концентрација андрогена (Т+DHT) у Лајдигоовим ћелијама.
- (9) Концентрација cAMP у TIF-у.
- (10) Концентрација cAMP у Лајдиговим ћелијама.
- (11) Вредност мембранског потенцијала митохондрија Лајдигових ћелија.
- (12) Релативна експресија гена (укупно 45 гена).
- (13) Релативна експресија протеина (укупно 8).

На крају поглавља су наведене статистичке анализе коришћене за обраду података.

IV поглавље: РЕЗУЛТАТИ (29 страна, 15 слика, 1 табела).

Текст је подељен у три функционалне целине, сходно специфичним циљевима.

(1) Стероидогена функција Лајдигових ћелија пацова и образац експресије елемената cAMP-PRKA сигналног пута мењају се након *in vivo* примене тестостерон-енантата.

Приказани су и описани резултати који показују да *in vivo* апликација ТЕ инхибира стероидогену функцију Лајдигових ћелија одраслих пацова, као и експресију гена за компоненте cAMP-PRKA сигнализације, као главног регулатора стероидогенезе ових ћелија. Супротно, примена ТЕ је стимулисала експресију хидроксистероид дехидрогеназе 3 бета (HSD3B), ензима који учествује у синтези тестостерона, андрогеног рецептора (AR), као и елемената JAK-STAT, укључене у регулацију експресије HSD3B.

(2) Молекулске адаптације Лајдигових ћелија током системске *in vivo* блокаде

андрогених рецептора

Приказани су и описани резултати који показују да је системска *in vivo* блокада AR потпуно или делимично превенирала ТЕ-поремећену хомеостазу интерстицијумске течности тестиса, функционалност Лајдигових ћелија, као и поремећен образац експресије компоненти стероидогене машинерије и cAMP-PRKA сигнализације.

(3) Стероидогена функција Лајдигових ћелија и обрасци експресије елемената cAMP-PRKA и JAK-STAT сигналних путева након директне *in vitro* примене тестостерона и блокатора андрогених рецептора.

In vitro блокада AR ципротерон-ацетатом у комбинацији са тестостероном је омогућила раздвајање тзв. директних аутокриних ефеката тестостерона од оних посредованих јукстракриним, паракриним, ендокриним и нервним факторима.

Резултати потврђују укљученост тестостерона и AR у комплексним механизмима регулације који су важни у адаптивном одговору неопходном за очување и спречавање потпуног губитка стероидогене функције Лајдигових ћелија, али истовремено представљају приказ молекулских догађаја који су последица примене AAS. Регистроване су промене у бројним параметрима функционалности Лајдигових ћелија настале као последица примене ТЕ, деривата Т који се најчешће употребљава у клиничкој пракси, али се у највећој мери и злоупотребљава и најпродаванији је на тзв. “црном” тј. илегалном тржишту.

Представљени и описани резултати објављени су у два рада категорије M21 на којима је кандидаткиња Маја Србован (рођена Бјелић) први аутор и наведени су у библиографији

V поглавље: ДИСКУСИЈА (19 страна, 5 слика)

Текст дискусије је подељен у пет целина, које, употпуњене литературним подацима, утемељују добијене резултате у општи скуп научних знања.

5.1. Тестостерон-енантат нарушава стероидогену функцију Лајдигових ћелија.

5.2. Образац експресије елемената cAMP-PRKA сигналног пута у Лајдиговим ћелијама нарушене стероидогене функције применом тестостерон-енантата.

5.3. Образац експресије елемената JAK-STAT сигналног пута и HSD3B ензима у Лајдиговим ћелијама нарушене стероидогене функције применом тестостерон-енантата.

5.4. Молекулске адаптације Лајдигових ћелија у условима системске *in vivo* блокаде андрогених рецептора.

5.5. Образац експресије елемената cAMP-PRKA сигналног пута у Лајдиговим ћелијама пацова третираних системским блокатором AR засебно и у комбинацији са ТЕ.

Наведен је фундаменталан и механистички значај резултата са аспекта расветљавања механизма деловања тестостерона у регулацији функције Лајдигових ћелија током поремећене хомеостазе организма. Поред тога, резултати су применљиви у клиничкој и форензичкој пракси, обзиром да је у *in vivo* моделу коришћен дериват тестостерона, ТЕ, у сличном маниру и у дози која се најчешће употребљава у клиничкој пракси, али се и у највећој мери злоупотребљава.

VI поглавље: ЗАКЉУЧЦИ (4 стране)

Сумирани су резултати добијени у дисертацији. Сходно циљевима и презентацији резултата, и закључци су подељени у две целине, а дате су и чињенице које потврђују закључке и одговарају параметрима праћеним током истраживања и наведеним у циљевима.

- (1) Дати су докази који потврђују да системска *in vivo* примена тестостерон-енантата, најчешће употребљаваног и злоупотребљаваног ААС, нарушава стероидогену функцију и профил експресије елемената cAMP-PRKA сигнализације (главног регулатора стероидогенезе) Лајдигових ћелија одраслих пацова.
- (2) Дати су докази који потврђују да андрогени рецептори посредују ефекте тестостерона и његовог деривата тестостерон-енантата на обрасце експресије елемената cAMP-PRKA сигналног пута и аутокрине/паракрине ефекте којима се тестиси и Лајдигове ћелије прилагођавају на поремећену хомеостазу андрогена у циљу спречавања потпуног губитка стероидогене функције.

VII поглавље: ЛИТЕРАТУРА (20 страна)

Списак 211 библиографских јединица коју чине рецензиране научне публикације које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава стање у области, познате, дискутабилне и непознате налазе, али и потврђује значај резултата докторске дисертације.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја (2xM21)

- (1) **Vjelic MM**, Stojkov NJ, Baburski AZ, Sokanovic SJ, Mihajlovic AI, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2014) Molecular adaptations of testosterone-producing Leydig cells during systemic *in vivo* blockade of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 396: 10-25. **IF= 4.405**
- (2) **Vjelic MM**, Stojkov NJ, Radovic SM, Baburski AZ, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2015) Prolonged *in vivo* administration of testosterone-enanthate, the widely used and abused anabolic androgenic steroid, disturbs prolactin and cAMP signaling in Leydig cells of adult rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 149: 58-69. **IF= 3.985**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја (3xM34)

- (1) **Vjelic MM**, Radovic SM, Kostic TS, Andric SA (2015) Testosterone- enanthate, the widely used and abused anabolic androgenic steroid, disrupt mitochondrial membrane potential and mitochondrial proteins involved in steroidogenic function of adult rat Leydig cells. *The third Congress of the Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology: REDOX MEDICINE, Reactive Species Signaling, Analytical*

Methods, Phytopharmacy, Molecular Mechanisms of Disease, Belgrade, Serbia, 25-26.09.2015.

- (2) **Bjelic MM**, Stojkov NJ, Mihajlovic AI, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2011) *In vivo* application of testosterone-enanthate, wide used and abused anabolic androgenic steroid, up-regulated androgen receptor (AR) and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta-5-delta-4 isomerase (3 β HSD) and disturbed steroidogenic machinery in Leydig cells of adult rats. *FEBS Advanced Lecture Course: Spetses Summer School on Nuclear Receptor Signalling in Physiology and Disease*. Greece, Island of Spetses, 28.08.-02.09.2011.
- (3) **Bjelic MM**, Mihajlovic AI, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS, Andric SA (2010) Testosterone treatment up-regulated androgen receptor (AR) and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta-5-delta-4 isomerase (HSD3B) and impaired Leydig cells steroidogenesis. *4th International Science Students' Conference*. The Netherlands, Nijmegen. 10-14.11.2010.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја (2xM64)

- (1) **Bjelic MM**, Radovic SM, Kostic TS, Andric SA (2015) *Anabolic androgenic steroids impair steroidogenic function of adult rat Leydig cells via disruption of mitochondrial membrane potential and mitochondrial transport machinery*. III Simpozijum biologa I ekologe Republike Srpske, Banja Luka, Bosna i Hercegovina, 12-14.11.2015.
- (2) **Bjelic MM**, Stojkov NJ, Mihajlovic AI, Sokanovic SJ, Baburski AZ, Janjic MM, Kostic TS, Andric SA (2011) *In vivo* tretman testosteron-enantatom stimuliše ekspresiju androgenog receptora (AR) i 3-beta-hidroksisteroid dehidrogenaze/delta-5-delta-4 izomeraze (3 β HSD) i narušava steroidogenu mašineriju u Leydig-ovim ćelijama adultnih pacova. *Prvi kongres: Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini*. Beograd, Srbija, 24.09.2011.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација кандидаткиње **Маје М Србован (рођене Бјелић)**, под насловом **“Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида”** представља вредан и аутентичан

научни рад који доприноси бољем разумевању молекуларних догађаја који су основа прилагођавања Лајдигових ћелија одраслих пацова на поремећену хомеостазу организма применом анаболичких андрогених стероида. Јасно дефинисане циљеве, који су засновани на добром познавању научне проблематике, пратила је успешна реализација истраживачког поступка. Поред доприноса основним истраживањима, резултати имају значаја и у примењеним истраживањима обзиром на широку употребу и злоупотребу анаболичких андрогених стероида у хуманој популацији.

На основу увида у истраживање и постигнуте резултате, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, **да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Маје М Србован, под насловом “Функционалност и образац сигналних путева Лајдигових ћелија одраслих пацова након примене анаболичких андрогених стероида” и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.**

У Београду, 09.06.2018. године

КОМИСИЈА:

(1) др Силвана Андрић, редовни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

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

(3) др Татјана Костић, редовни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

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