

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.07.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Иване Грковић и проф. др Надежде Недељковић о урађеној докторској дисертацији **Наташе Љ. Митровић**, истраживач-сарадника Института за Нуклеарне Науке "Винча", Универзитета у Београду, под насловом „**Ванћелијски метаболизам аденинских нуклеотида у синаптозомима хипокампуса пацова – полне специфичности и улога женских полних хормона**“. На истој седници одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Ивана Грковић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ - ментор, др Надежда Недељковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет - ментор, др Ивана Бјелобаба, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - члан, др Предраг Вујовић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет - члан, др Мирослав Аџић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ - члан.

Комисија је прегледала докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Наташе Митровић, написана је на 114 страна и садржи поглавља: Увод (29 страна), Циљеви рада (2 стране), Материјал и методе (20 страна), Резултати (31 страна), Дискусија (16 страна), Закључци (3 стране) и списак цитиране литературе (13 страна). Резултати представљени у дисертацији илустровани су графицима и панелима (20), а део резултата представљен је табеларно (2). У дисертацији је цитирано 229 библиографских јединица. Уз наведена поглавља, дисертација обухвата сажетак на српском и енглеском језику и списак примењених скраћеница, биографију кандидата, публиковане радове и неопходне изјаве.

Анализа докторске дисертације:

Докторска дисертација Наташе Митровић бави се улогом женских полних хормона, естрадиола и прогестерона у регулацији експресије ектонуклеотидаза у мозгу пацова оба пола. Ектонуклеотидазе су ензими на спољашњој страни ћелијске мембране свих типова ћелија у централном нервном систему (ЦНС). Ови ензими катализују секвенцијалну хидролизу естарских веза између фосфатних група аденозин-трифосфата (АТФ), чиме редом настају аденозин-дифосфат (АДП), аденозин-монофосфат (АМФ) и

коначно аденозин. У ванћелијском простору, АТР и аденозин делују као паракрини сигнални молекули са изузетно значајним улогама у ЦНС. Они остварују трофичке ефекте, делују као неуротрансмитери и неуромодулатори, а при повишеним концентрацијама делују као цитокини са пресудним утицајем на функционални фенотип микроглије и астроцита. С обзиром на то да концентрације АТР и аденозина у ванћелијском простору директно зависе од активности ектонуклеотидаза, те да свака промена активности ових ензима може бити релевантна у контексту физиологије и патологије, циљ ове докторске дисертације био је да се утврди да ли су ектонуклеотидазе регулисане женским полним хормонима. Овај циљ посебно је важан у контексту сталних флукуација женских полних хормона током животног циклуса женки сисара (пре-пубертетски период, пубертет, репродуктивна зрелост, менопауза). Такође, женски полни хормони (посебно 17β -естрадиол), утичу на густину синапси, сложеност дендритских гранања и број трноликх израштаја у хипокампусу, остварујући тако снажан утицај на синаптичку пластичност, учење и памћење код пацова оба пола. Стога су истраживања у оквиру ове дисертације обављена на фракцији синаптозома хипокампуса пацова оба пола, третираних женским полним хормонима у режиму једнократне и виšekратне примене.

Поглавље **Увод** започиње детаљним описом улоге АТР и пуринских нуклеотида у ванћелијском простору, њиховим складиштењем у везикуле и путевима ослобађања у ванћелијски простор. Кандидаткиња затим даје преглед класа пуринских рецептора, P1 и P2, као и механизме трансдукције сигнала. Следи опис секвенцијалне хидролизе нуклеотида у ванћелијском простору, као и преглед биохемијских и функционалних карактеристика неколико представника фамилије ектонуклеотидаза - ектонуклеозид-трифосфат дифосфохидролазе 1-3 (НТПД-азе 1-3), екто-5'-нуклеотидазе (еН) и ткивно неспецифичне алкалне фосфатазе (ТНАП). Посебан део овог поглавља посвећен је опису метаболизма ванћелијских аденинских нуклеотида у синаптичком одељку и њиховој улози у неуротрансмисији. Следи опис улоге женских полних хормона у ЦНС и механизми деловања ових хормона, као и специфичне улоге женских полних хормона у хипокампусу, флукуације хормона у хипокампусу током еструсног циклуса са посебним освртом на процес спиногенезе и реаранжирања синапси који се одвијају под деловањем 17β -естрадиола. На крају, кандидаткиња даје преглед оскудних литературних података који се односе на улогу женских полних хормона на активност ектонуклеотидаза и потенцијалне полне разлике.

У поглављу **Циљеви рада** кандидаткиња прецизно дефинише циљеве докторске тезе и експерименталне задатке у оквиру тих циљева: 1) испитавање улоге женских полних хормона у модулацији/регулацији ванћелијског метаболизма аденинских нуклеотида у синаптозомима хипокампуса женки пацова, са посебним освртом на питања да ли ендогене флукуације женских полних хормона током еструсног циклуса утичу на активност НТПД-аза и еН; да ли уклањање јајника, који су најважнији извор женских полних хормона, утиче на промену активности ектонуклеотидаза; да ли третман 17β -естрадиолом (Е2) мења функцију НТПДазе 1-3 и еН у синаптозомима хипокампуса женки пацова; каква је улога естрадиолских рецептора, $ER\alpha$ и $ER\beta$, у модулацији/регулацији активности и протеинској експресији еН након *in vivo* и *in vitro* третмана специфичним агонистима естрадиолских рецептора (PPT и DPN) и неспецифичним антагонистом (ICI); 2) испитивање улоге 17β -естрадиола на активност и експресију ектонуклеотидаза у хипокамбалним синаптозомима мужјака пацова, и конкретно: да ли уклањање тестиса, који су примарни извор мушких полних хормона, утиче на промену активности ектонуклеодаза у синаптозомима мужјака пацова; да ли третман 17β -естрадиолом (Е2) мења функцију НТПД-аза 1-3 и еН; каква је улога $ER\alpha$ и $ER\beta$ у модулацији еН у синаптозомима полно зрелих мужјака; да ли аплицирана доза Е2 изазива синаптичке реаранжмане у хипокампусу мужјака; 3) испитивање ефекта поновљеног (седмодневног)

третмана стероидним хормонима на активност и експресију еН у хипокампусу оваријектомисаних женки и мужјака пацова: да ли постоје полне специфичности у експресији еН у хипокампусу пацова; какав је ефекат оваријектомије на базалну активност и експресију еН у хипокампусу пацова; какав је ефекат поновљених третмана стероидним хормонима (Е α , Е2, Р4) на транскрипциону, транслациону и функционалну експресију еН у хипокампусу пацова оба пола.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња даје детаљан преглед општих и специфичних хемикалија, као и опис експерименталних група, третмана и примењених метода. Кандидаткиња даје табеларни приказ експерименталних група које су коришћене у експериментима: интактне женке по фазама еструсног циклуса, оваријектомисане женке и шам-контроле, интактни мужјаци, орхиектомисани мужјаци и шам-оперисани мужјаци. Све ове групе подвргнуте су хормонским третманима у режиму једнократне или вишекратне администрације

У поглављу **Резултати**, сагласно формулисаним експерименталним задацима, кандидаткиња даје детаљан опис и графички приказ добијених резултата. Упоредном анализом хидролизе АТР и АДФ у синаптозома хипокампуса женки у различитим стадијумима еструсног циклуса (проеструс, еструс, диеструс) кандидаткиња показује флукуације активности ектонуклеотидаза током еструсног циклуса, при чему је хидролиза АТР и АДФ највећа у еструсу, смањује се након билатералне оваријектомије у односу на испитиване фазе циклуса, а значајно се повећава након једнократног третмана естрадиолом. У истом третману уочава повећање експресије протеина НТПД-азе 1 и 2 и непромењену заступљеност НТПД-азе 3.

Пратећи активност и експресију еН током фаза еструсног циклуса, кандидаткиња указује на реципрочан образац промена хидролизе АМП и заступљености еН протеина током фаза еструсног циклуса. Допринос ендогених полних хормона испитује након оваријектомије у односу на фазе еструсног циклуса и закључује да је измерена активност слична измереној у диеструсу, док је релативна количина протеина непромењена у односу на диеструс. Анализирајући кинетичке параметре, кандидаткиња даје објашњење уочених промена, закључујући да су промене специфичне активности еН у синаптозома хипокампуса оваријектомисаних женки, а без промена у количини протеина, условљене променама афинитета према супстрату и смањењем специфичне брзине реакције, што указује на могућу интеракцију естрадиола са протеинским молекулом еН. Кандидаткиња даље показује да су активност и експресија еН позитивно регулисани естрадиолом 24 часа након третмана оваријектомисаних женки овим хормоном. Примењујући специфичне агонисте и антагонисте рецептора ЕР α и ЕР β , показује да су оба типа рецептора укључена у уочене ефекте. Утврђено је да је за базалну експресију еН неопходна активација најмање једног типа ЕР. Третмани РРТ-ом и ДРН-ом даље указују на могући механизам деловања Е2 на еН. На основу ових резултата закључује се да Е2, делујући на ЕР α повећава заступљеност еН у синаптичким мембранама, што последично повећава хидролизу АМП, док активација ЕР β доводи само до пораста активности еН. Ови налази су потврђени у *in vitro* приступу, третирањем синаптозома РРТ-ом, ДРН-ом али и Е2 и Е-BSA, у опсегу концентрација ових лиганата. На основу ових резултата закључује се да је неопходан пролазак Е2 кроз ћелијску мембрану, те да вероватно, активирајући ЕР β , овај хормон индукује алостеричну модулацију еН која доводи до промена у активности, док се активацијом ЕР α иницира *de novo* синтеза еН протеина. Постојање физичке интеракције естрадиолских рецептора са еН доказана је методом коимунопреципитације.

У одгонетању улоге полних стероида у регулацији ектонуклеотидаза, испитана је и улога мушких полних хормона у хидролизи АТР, АДФ и АМП у синаптозома хипокампуса мужјака пацова. Упоређујући брзину реакције код лажно-оперисаних и орхиектомисаних мужјака, кандидаткиња закључује да активност ектонуклеотидаза не

зависи од тестостерона. У даљим експериментима она испитује да ли Е2 у истим дозама које су примењене код женки, остварује утицај на активност у синаптозома мужјака пацова. Показује да третман Е2 смањује хидролизу свих нуклеотида и протеинску експресију НТПД-азе 1, НТПД-азе 2, те да не остварује утицај на експресију НТПД-азе 3 и еН. Осим тога, уочено је да исти третман троструко повећава активност ТНАП. Ова два налаза указују да би смањена активност ектонуклеотидаза могла бити компензована значајним повећањем активности ТНАП који уклања вишак тако акумулираних аденинских нуклеотида из синаптичке пукотине. Смањење активности еН, које није праћено мерљивим променама протеинске експресије овог ензима, кандидаткиња објашњава резултатима анализе кинетичких параметара и закључује да је активност еН компетитивно инхибирана. Након *in vivo* и/или *in vitro* третмана антагонистом, специфичним агонистима ER, Е2 и Е-BSA закључује да је активност еН модулисана координисаном активношћу ER α и ER β , као и покретањем мембранских механизма независних од класичних унутарћелијских ER.

Посебан део ове дисертације односи се на испитивање способности естрадиола да индукује синаптичке реаранжмане у хипокампусу мужјака. С тим циљем је праћена активација сигналних путева Erk1/2, Akt, mTOR и експресија пре- и постсинаптичких маркера синаптофизина (SYP) и синтаксина 1 (Syn1), с једне, односно PSD95 протеина, NR1 и NR2B субјединица глутаматног NMDA рецептора, с друге стране, а који представљају функционалне маркере формирања трноликих израштаја. Показано је да Е2 иницира ремоделовање и формирање нових синапси у хипокампусу мужјака пацова, па се закључује да су ови процеси су у основи уоченог смањења хидролизе аденинских нуклеотида у синаптозома мужјака пацова.

Након испитивања потенцијалне модулације/регулације еН естрадиолом код оваријектомисаних женки и утицаја акутног третмана Е2 на функцију овог ензима у синаптозома изолованим из хипокампуса мужјака, у посебним експериментима кандидаткиња прати ефекте седмодневног третмана 17 α -естрадиолом (Е α), Е2 и прогестероном (P4) у укупној мембранској фракцији изолованој из хипокампуса оваријектомисаних женки и мужјака пацова. На основу ових резултата закључује се да поновљени третмани применом Е α , Е2 и P4 не доводе до промена експресије еН у хипокампусу мужјака пацова, док промене у експресији иРНК и протеина, и активност еН у хипокампусу оваријектомисаних женки пацова зависе од примењеног хормона.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња критички и научно утемељено дискутује добијене резултате и интерпретира их у складу са релевантним подацима из доступне литературе. Ово поглавље је подељено у неколико одељака што доприноси бољем разумевању и тумачењу резултата истраживања у односу на резултате објављене у постојећој научној литератури. У првом одељку кандидаткиња дискутује о ефектима женских полних хормона током еструсног циклуса, оваријектомије и једнократног третмана естрадиолом на активност и/или протеинску експресију НТПД-аза 1-3 у хипокампусним синаптозома женки пацова. Даље, кандидаткиња дискутује о утицају циркулишућих полних хормона током еструсног циклуса и након оваријектомије на активност и протеинску експресију еН. С обзиром на то да посебан акценат ове тезе представља потенцијална регулација/модулација еН полним хормонима, посебно естрадиолом, у синаптозома хипокампуса код животиња оба пола, кандидаткиња је довела у везу уочене промене активности и протеинске експресије током еструсног циклуса, након оваријектомије и третмана естрадиолом са ендегеном флукуацијом и познатим променама концентрација хормона у хипокампусу женки пацова. Ово је прва студија у којој је испитивана улога ER у регулацији/модулацији еН у неком од региона ЦНС-а. Примењујући различите методе и приступе, кандидаткиња је недвосмислено показала да је овај ензим директно и/или индиректно модулисан класичним ER. Посебан

део посвећен је дискусији резултата о улози естрадиола у активности и експресији НТПД-аза 1-3, еН и активности ТНАП у синаптозома хипокампуса мужјака али и синаптичким реаранжманима који су индуковани естрадиолом и налазе се у основи уочених промена активности и експресије испитиваних ектонуклеотидаза. Потом следи одељак у коме кандидаткиња дискутује ефекте поновљених третмана Е α , Е2 и Р4 на експресију еН у хипокампусу мужјака и оваријектомисаних женки. Последњи део дискусије односи се на потенцијалне полне специфичности у метаболизму ванћелијских аденинских нуклеотида у хипокампусу, где поредећи резултате испитивања оба пола кандидаткиња даје критички осврт на питање: да ли полне разлике у регулацији активности и експресије испитиваних ектонуклеотидаза уопште постоје? Како су досадашња истраживања о улози полних хормона у експресији и активности испитиваних ектонуклеотидаза веома оскудна, резултати добијени у овој докторској тези отварају ново поље истраживања. Проширивање и продубљивање научних сазнања о механизмима деловања женских полних хормона посебно у мушком мозгу значајно би допринео и сигурнијој примени стероидних хормона у терапији појединих обољења ЦНС.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња сумира најважније закључке који произилазе из експерименталних резултата добијених у докторској дисертацији. Главни закључци докторске дисертације су следећи

1. Активност и експресија ектонуклеотидаза у синаптичким одељцима хипокампуса женки пацова под регулаторном су контролом ендогених хормона јајника.
2. Е2 модулише ванћелијски метаболизам аденинских нуклеотида у синаптозома хипокампуса мужјака пацова
3. Поновљени (седмодневни) третмани естрадиолом (Е2) и прогестероном (Р4) и 17 α -естрадиолом (Е α) не доводе до промена експресије еН у хипокампусу мужјака пацова.
4. Поновљени (седмодневни) третмани Е2 и Р4 мењају експресију еН и метаболизам аденинских нуклеотида у хипокампусу женки пацова.
5. Упоредивањем ефеката хормона на узорцима мушког и женског мозга пацова, нису утврђене јасне разлике између полова у погледу хормонске регулације ектонуклеотидаза у хипокампусу: а) НТПД-аза 1, НТПД-аза 2 и еН су модулисани/регулисани Е2, док НТПД-аза 3 није под контролом женских полних хормона у синаптозома хипокампуса оба пола; б) Ефекти Е2 на нивоу еН су специфични за тип ћелија; в) Уочене разлике међу половима могу се приписати различитим механизмима којима Е2 остварује своје ефекте на ектонуклеотидазе у синаптозома хипокампуса, а који вероватно зависе од интрахипокампадне концентрације и различитог метаболизма Е2 код женки и мужјака.

На основу свих закључака, кандидаткиња износи генерални закључак да су испитиване ектонуклеотидазе у синаптичком одељку хипокампуса под фином и сложеном контролом ендогених хормона јајника. Имајући у виду многобројне улоге ванћелијског АТР и аденозина као сигналних молекула, као и чињеницу да НТПД-аза 1 и еН, поред каталитичке, имају и функцију адхезионих молекула, резултати ове докторске дисертације указују да би испитивани ензими могли бити укључени у процесе синаптичких реаранжмана и одржању конективности унутар когнитивних мрежа хипокампуса. Такође, промене у функционалности испитиваних ензима, могу представљати један од механизма адаптације хипокампуса у одговору на многа физиолошка и афизиолошка стања која се одликују променом нивоа женских полних хормона у циркулацији (пубертет, трудноћа, менопауза, хируршко уклањање јајника). Такође, резултати указују и на могуће механизме деловања и ефекте 17 β -естрадиола у заменским терапијама оба пола.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M22 Mitrović N, Zarić M, Drakulić D, Martinović J, Stanojlović M, Sevigny J, Horvat A, Nedeljković N, Grković I.** 17 β -Estradiol upregulates ecto-5'-nucleotidase (CD73) in hippocampal synaptosomes of female rats through action mediated by estrogen receptor- α and - β . *Neuroscience* 2016;324:286–296.
2. **M22 Mitrović N, Guševac I, Drakulić D, Stanojlović M, Zlatković J, Sévigny J, Horvat A, Nedeljković N, Grković I.** Regional and sex-related differences in modulating effects of female sex steroids on ecto-5'-nucleotidase expression in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Gen Comp Endocrinol.* 2016;235:100-107
3. **M23 Grković I, Bjelobaba I, Mitrović N, Lavrnja I, Drakulić D, Martinović J, Stanojlović M, Horvat A, Nedeljković N.** Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase3 (NTPDase3) in the female rat brain during postnatal development. *J Chem Neuroanat.* 2016;77:10-18

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M33 Mitrović N., Guševac I., Stanojlović M., Drakulić D., Zlatković J., Zarić M., Horvat A., Grković I.** (2015) Effects of Estradiol on Ecto-5'-nucleotidase in the rat hippocampus. FENS Featured Regional Meeting. Thessaloniki, October 7-10, Abstract Number: MO10.
2. **M33 Mitrović, N., Guševac, I., Stanojlović, M., Drakulić, D., Zlatković, J., Zarić, M., Horvat, A., Grković, I.** (2015) Effects of steroid hormones on ecto-5'-nucleotidase expression in rat hippocampus. 11th YSA PhD, Vienna, June 10-11, Abstract Number: 215.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Наташе Митровић** под насловом „**Ванћелијски метаболизам аденинских нуклеотида у синаптозомима хипокампуса пацова – полне специфичности и улога женских полних хормона**“ резултат је дуготрајног, преданог и научно утемељеног експерименталног истраживања. Анализа научног поступка примењеног у изради ове докторске тезе сведочи о озбиљности и зрелости кандидаткиње, која је, полазећи од постављених хипотеза, најпре формулисала прецизне експерименталне задатке и циљеве, а затим у складу са њима изабрала одговарајуће експерименталне приступе и методе. Када је реч о научном доприносу, ова докторска теза

даје читав низ оригиналних података о улози полних хормона у активности и експресији ектонуклеотидаза код оба пола. Неоспоран квалитет дисертације потврђује и чињеница да је део резултата до сада објављен у три истакнута међународна часописа, а четврти рад је на рецензији што додатно потврђује мишљење Комисије да резултати тезе представљају значајан помак у области пуринске сигнализације. Многи резултати добијени у оквиру ове тезе неоспорно су отворили и нова питања која ће, надамо се, бити предмет истраживања овог истраживача у будућности.

На основу свега изложеног Комисија сматра да докторска теза **Наташе Митровић** под насловом „**Ванћелијски метаболизам аденинских нуклеотида у синаптозомима хипокампуса пацова – полне специфичности и улога женских полних хормона**“ представља вредан научни допринос изучавањима у области пуринске сигнализације и неуробиологије уопште и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај и одобри Наташи Митровић јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

др Ивана Грковић, научни сарадник
Универзитет у Београду -
Институт за нуклеарне науке „Винча“

др Надежда Недељковић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Ивана Бјелобаба, виши научни сарадник
Универзитет у Београду -
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Предраг Вујовић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Мирослав Ацић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду -
Институт за нуклеарне науке „Винча“

У Београду, 02.09.2016.