

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 Слађане Дроњак Чучаковић, научног саветника Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду и др Небојше Јаснића, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **Предрага З. Јовановића**, истраживача сарадника Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, под насловом **„Дејство окситоцина на симпатоадреномедуларни систем и срце пацова хронично излаганих стресу изолације“**. На истој седници одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

Др **Слађана Дроњак Чучаковић**, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду,

Др **Небојша Јаснић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду,

Др **Наташа Спасојевић Поповић**, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду,

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Предрага З. Јовановића, истраживача сарадника, под насловом „Дејство окситоцина на симпатоадреномедуларни систем и срце пацова хронично излаганих стресу изолације“ садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област, Ужа научна област и УДК број), Скраћенице, Садржај, Текст рада по поглављима, Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу. Докторска дисертација је написана на 134 страна, илустрована је са 33 слика, 2 табеле и подељена је у 7 поглавља:

Увод (25 страна, 2 слике), Циљ рада (2 стране), Материјал и методе (15 страна, 2 слике, 2 табеле), Резултати (40 страна, 29 слика), Дискусија (26 страна), Закључци (4 стране) и Литература (22 страна са 210 референце).

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** дат је детаљан приказ досадашњих сазнања из области које су непосредно везане за предмет истраживања докторске дисертације. Дат је историјски преглед који је водио до настанка савременог тумачења концепта стреса. Описан је одговор организма на стрес. Посебан осврт је дат на стрес социјалне изолације као предмет истраживања ове дисертације и на до сада познате ефекте које ова врста стреса има на животиње и човека. Детаљно је описан процес синтезе, ослобађања, поновног преузимања, инактивације и деградовања катехоламина са посебним нагласком на биосинтетски ензим тирозин хидроксилазу (ТН), норадреналински транспортер (NET) и везикуларно моноамински транспортер (VMAT). Објашњен је механизам деловања катехоламина путем адреналинских рецептора а пре свега је појашњен механизам деловања на бета3 адреналински рецептор (β_3 -AR). На основу литературних података дате су информације о функцији и реакцији периферног катехоламинског система са посебним освртом на промене биосинтетског ензима ТН и два транспортера NET и VMAT2 у зависности од типа и трајања стреса. Наведени су подаци о синтези окситоцина (ОХТ) и присуству окситоцинског рецептора (OXTR) у различитим ткивима као и о главним физиолошким ефектима и клиничкој примени ОХТ. Дати су литерални податци о ефекту ОХТ у условима стреса и о његовом деловању на друге хормоне који се лучше током стреса. Посебна пажња је посвећена до сада доступним подацима о ефектима ОХТ на кардиоваскуларни систем у условима стреса.

У поглављу **ЦИЉ РАДА** јасно и концизно су изнети циљеви докторске дисертације: испитати дејство ОХТ на понашање; испитати утицај третмана ОХТ у трајању од 14 дана на количину адреналина (ADR) и норадреналина (NA) у крви, сржи надбубрежне жлезде, стелатној ганглији и срцу нестресираних пацова као и пацова изложених стресу социјалне изолације у трајању од 12 недеља; испитати утицај третмана ОХТ у трајању од 14 дана на експресију гена за ТН, NET и VMAT2 у сржи надбубрежне жлезде, стелатној ганглији и срцу као и за мускарински и адреналински рецептор у срцу код нестресираних пацова као и пацова изложених стресу социјалне изолације у трајању од 12 недеља; испитати утицај третмана ОХТ у трајању од 14 дана на хистолошке промене у срцу код нестресираних пацова као и пацова изложених стресу социјалне изолације у трајању од 12 недеља.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описан је експериментални протокол којем су животиње биле подвргнуте а који је подразумевао социјалну изолацију у трајању од 12 недеља, при чему су последње две недеље животиње биле третиране ОХТ једном дневно. Експеримент је организован у три серије. Описан је протокол теста отвореног поља и параметри који су праћени. Описан је и процес канилације животиња и поступак узимања крви. Пре почетка третмана ОХТ и пре жртвовања животињама је била измерена телесна тежина. Изолована су следећа ткива: срж надбубрежне жлезде, лева и десна стелатна ганглија, лева и десна преткомора и лева и десна комора, при чему се мерила тежина целе надбубрежне жлезде и срца. Хистолошке промене на нивоу срчаних комора праћене су HE бојењем и диференцијалним ткивним бојењем. Након стандардних лабораторијских протокола припреме ткива: хомогенизовања, центрифугирања у зависности од протокола методе која се користи урађено је мерење нивоа ADR и NA у

плазми и испитиваним ткивима радиоензимском методом, мерени су нивои експресије гена (нивои iRNK и протеина) за TH, NET, VMAT2, β_3 -AR и M₂ MR у ткивима RT-PCR и Western blot методом. Резултати експеримента су статистички анализирани коришћењем анализе варијанси са три или два фактора (Three-way ANOVA, Two-way ANOVA) и Tukey Post-hoc анализом.

Приказ **РЕЗУЛТАТА** организован је у складу са постављеним циљевима. Резултати експеримената приказани су графички са објашњењима у легендама. Најважнији експериментални резултати изнети у овој докторској дисертацији обухватају више целина. Први део резултата укључује податке добијене на тесту отвореног поља. Други део се односи на физиолошке параметре телесне тежине и тежина срца и надбубрежне жлезде као и количине катехоламина у плазми. У следећим поглављима презентовани су резултати количине катехоламина у ткиву као и нивои експресије гена за TH, NET и VMAT2 у сржи надбубрежне жлезде и левој и десној стелатној ганглији, као и експресија гена за β_3 -AR, M₂ MR и iNOS у левој и десној преткомори и комори у испитиваним групама. У последњем поглављу презентовани су резултати хистолошке анализе леве и десне коморе испитиваних група.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** тумаче се добијени резултати и пореде се са досадашњим литературним сазнањима из дате области истраживања.

Ради бољег сагледавања, пратећи изложене функционалне целине, комисија истиче и анализира најзначајније резултате који су добијени у овој докторској дисертацији.

Резултати који се односе на понашање животиња указују да је стрес социјалне изолације имао ефекта на одређене параметре који су праћени у тесту отвореног поља и који указују на анксиогени ефекат овог типа стреса. Третман ОХТ је довео до анксиолитичког ефекта. Добијени резултати су потврдили анксиолитичко дејство ОХТ.

Стрес социјалне изолације и третман ОХТ нису имали ефекта на телесну тежину животиња. Показано је да третман ОХТ има ефекат на увећање надбубрежне жлезде што се тумачи повећањем броја хромафинских ћелија услед повећања нивоа NA и ADR у сржи надбубрежне жлезде. Третман ОХТ доводи и до смањења релативне тежине срца. Излагање социјалној изолацији у трајању од 12 недеља доводи до значајног повећања нивоа ADR и NA у плазми. Значајно повећање ADR и NA у плазми социјално изолованих пацова, могу указивати да је у сржи надбубрежне жлезде ниво NET, транспортера одговорног за поновно преузимање ослобођених катехоламина смањен. Двонедељни третман ОХТ код социјално изолованих пацова доводи до статистички значајног смањења нивоа ADR и NA у плазми. Већа концентрација ОХТ у циркулацији је повезана са нижим нивоом NA у плазми, односно постоји обрнута сразмера у њиховим концентрацијама.

Сумирајући резултате за процес синтезе, преузимања и складиштења катехоламина у сржи надбубрежне жлезде можемо закључити да периферни третман ОХТ у трајању од 14 дана код нестресираних животиња има ефекта на катехолаmine у сржи надбубрежне жлезде, тако што мења експресију VMAT2 протеина, доводећи до повећања нивоа катехоламина. Када говоримо о хронично изолованим животињама изгледа да третман ОХТ има већи утицај на процес преузимања и складиштења катехоламина, него на синтезу катехоламина. Добијени резултати показују да третман ОХТ поспешује складиштење катехоламина у стањима неизмењене хомеостазе као и да додатно поспешује процесе и преузимања и складиштења у сржи надбубрежне жлезде хронично изолованих животиња.

На основу добијених резултата експресије гена за TH, NET и VMAT2 у стелатним

ганглијама можемо закључити да постоји асиметрија у активности леве и десне стелатне ганглије условима нарушене хомеостазе и повећане симпатичке активности. Активност десне стелатне ганглије у условима хроничне изолације у трајању од 12 недеља је значајно већа у односу на леву, која се огледа у повећању експресију гена за ТН и NET. Третман ОХТ у трајању од 14 дана је довео до смањења ТН протеина у десној стелатној ганглији код социјално изолованих животиња. Ови резултати наводе на закључак да ОХТ може да утиче на одговор кардиоваскуларног система у условима стреса на начин да регулише смањено ослобађање NA у срце.

Добијени резултати указују на различиту регулацију синтезе, преузимања и складиштења NA у условима стреса између леве и десне преткоморе. Лева преткомора је реаговала повећаним отпуштањем NA, док се у десној преткомори развио адаптациони механизам који омогућава очување катехоламинских депоа. Третман ОХТ није значајније утицао на синтезу, преузимање и складиштење катехоламина у преткоморама. Резултати показују да третман ОХТ доводи до повећања нивоа протеина β_3 -AR и на тај начин остварује свој кардиопротективни ефекат у преткоморама.

У левој комори стрес хроничне социјалне изолације је повећао ниво NA и ТН протеина без промена експресије гена за транспортере, док је у десној комори повећао експресију гена за ТН без промене нивоа транспортера и количине NA. Третман ОХТ у трајању од 14 дана повећао је ниво NET протеина у левој комори и довео до различите регулације VMAT2 у коморама. Стрес социјалне изолације није довео до промена у нивоу β_3 -AR у левој и десној комори док је третман довео до смањења нивоа β_3 -AR протеина и повећања ниво експресије гена за M_2 MR у левој комори без промене ова два рецептора у десној комори. Стрес социјалне изолације је довео до повећања нивоа iNOS протеина у левој комори без даљих промена третманом са ОХТ. ОХТ је остварио кардиопротективно дејство повећањем нивоа M_2 MR рецептора у левој комори.

Стрес социјалне изолације је довео до хипертрофије леве срчане коморе а ОХТ је показао антихипертрофично дејство, тако што је смањio увећане кардиомиоците настале као последица излагања животиња хроничној социјалној изолацији у трајању од 12 недеља.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно и концизно се износе закључци добијени анализирањем експерименталних резултата. У овој докторској дисертацији је показано да у сржи надбубрежне жлезде ОХТ поспешује складиштење катехоламина у условима неизмењене хомеостазе, док је у условима стреса социјалне изолације поред повећаног складиштења, повећао и процес преузимања катехоламина, без утицаја на синтезу катехоламина. Показано је да је ОХТ смањio повећану симпатичку активност десне стелатне ганглије у условима стреса, смањујући синтезу катехоламина. У срцу ОХТ није значајније утицао на синтезу, преузимање и складиштење катехоламина у преткоморама у условима стреса, док је повећањем нивоа NET протеина у левој комори испољио кардиопротективни ефекат у условима стреса. ОХТ је остварио кардиопротективно дејство у срцу, повећањем ниво β_3 -AR у преткоморама и повећањем нивоа M_2 MR рецептора у левој комори. ОХТ је показао антихипертрофично дејство у левој комори, тако што је смањio увећане кардиомиоците настале као последица излагања животиња хроничној социјалној изолацији у трајању од 12 недеља. Све ово наводи на закључак да је ОХТ део система који у условима стреса помаже у успостављену нарушене хомеостазе.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** дата је листа од 210 библиографских јединица које су коришћене током израде ове докторске дисертације. За адекватно објашњење резултата

ове докторске дисертације коришћена је најновија научна литература.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Jovanovic P**, Stefanovic B, Spasojevic N, Puskas N, Dronjak S (2016) Effects of oxytocin on adreno-medullary catecholamine synthesis, uptake and storage in rats exposed to chronic isolation stress. *Endocr Res* 41(2): 124-31 doi: 10.3109/07435800.2015.1094086
2. **Jovanovic P**, Stefanovic B, Spasojevic N, Dronjak S (2014) Differential expression of tyrosine hydroxylase and transporters in the right and left stellate ganglion of socially isolated rats. *Auton Neurosci* 181:85-9 doi: 10.1016/j.autneu.2014.01.002.
3. **Jovanovic P**, Stefanovic B, Spasojevic N, Bozovic N, Jasnic N, Djordjevic J, Dronjak S (2014) Peripheral oxytocin treatment affects the rat adreno-medullary catecholamine content modulating expression of vesicular monoamine transporter 2. *Peptides* 51:101-4 doi: 10.1016/j.peptides.2013.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Предрага З. Јовановића, истраживача сарадника под насловом **„Дејство окситоцина на симпатoadреномедуларни систем и срце пацова хронично излаганих стресу изолације“** представља оригиналан научни рад са јасно осмишљеним, дефинисаним и оствареним циљевима. У овој докторској дисертацији коришћене су савремене експерименталне методе, а истраживања су обављена по свим критеријумима научно-истраживачког рада. Резултати ове докторске дисертације су јасно и концизно приказани, критички дискутовани, а закључци сажето изведени.

На основу свега изложеног, комисија закључује да је предвиђени предмет истраживања ове докторске дисертације веома актуелан и да даје релевантан одговор на постављене циљеве. Када је реч о научном доприносу, ова докторска теза даје читав низ нових података о досада неиспитаном ефекту ОХТ на процесе синтезе, преузимања и складиштења и деловања катехоламина у симпатoadреналном систему и кардиоваскуларној регулацији у условима стреса. Неоспоран квалитет дисертације потврђује и чињеница да је део резултата до сада објављен у три часописа међународног значаја. Многи резултати добијени у оквиру ове тезе представљају прве податке у литератури и као такви су неоспорно отворили и нова питања која ће, надамо се, бити предмет истраживања овог истраживача у будућности.

Предраг З. Јовановић, истраживач сарадник је током израде ове докторске дисертације показао висок степен компетентности, као и смисао за комплексне истраживачке приступе. Кандидат у својој области истраживања до сада, заједно са радовима који су проистекли директно из ове докторске дисертације, има 15 објављених научних радова у часописима међународног значаја.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидата Предрага З. Јовановића, истраживача сарадника под насловом **„Дејство окситоцина на симпатoadреномедуларни систем и срце пацова хронично излаганих стресу изолације“**.

КОМИСИЈА:

др Слађана Дроњак Чучаковић, научни саветник
Института за нуклеарне науке „Винча“
Универзитета у Београду

др Небојша Јаснић, ванредни професор Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

др Наташа Спасојевић Поповић, научни сарадник
Института за нуклеарне науке „Винча“
Универзитета у Београду

У Београду, 10.10. 2016 године