

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 8. марта 2024. године, на основу молбе ментора, **др Слађане Дроњак Чучаковић**, научног саветника Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију и **др Небојше Јаснић**, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милице Д. Јанковић**, истраживача сарадника, Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију – Универзитета у Београду, под насловом: **„Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије“**, у саставу:

1. **др Наташа Спасојевић Поповић**, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију – Универзитет у Београду;
2. **др Ива Лакић**, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду;
3. **др Мирослав Ацић**, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију – Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Научно-наставном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Милице Јанковић**, под насловом **„Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у**

хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије“, урађена је у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију, у оквиру истраживачке теме Ев.бр.0902301, чији је руководилац др Слађана Дроњак Чучаковић, НСВ. Израда докторске дисертације је финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја (број уговора: 451-03-47/2023-01/200017). Све експерименталне процедуре одобрене су од стране Етичке комисије Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду (евиденциони број дозволе: 323-07-04254/2016-05 и 323-07-03311/2017-05).

Докторску дисертацију чине следећи делови: непагиниране насловне стране на српском и енглеском језику (2 стране), подаци о менторима и члановима Комисије за преглед и оцену докторске дисертације (1 страна), захвалница (1 страна), сажетак на српском и енглеском језику, са издвојеним кључним речима (2 стране), листа скраћеница коришћених у тексту дисертације (3 стране) и садржај (3 стране). Докторска дисертација написана је на 124 страна куцаног текста у фонту *Times New Roman*, прореда 1, величине слова 12 пт, садржи 30 слика, 4 табеле, 553 литературна цитата, и подељена је у седам поглавља: УВОД (36 страна), ЦИЉЕВИ (1 страна), МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ (15 страна), РЕЗУЛТАТИ (18 страна), ДИСКУСИЈА (18 страна), ЗАКЉУЧЦИ (2 стране) и ЛИТЕРАТУРА (25 страна). У оквиру прилога датих на крају докторске дисертације се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет истраживања докторске дисертације **Милице Јанковић** је изучавање улоге ендоканабиноида на понашање, синтезу и разградњу катехоламина и катехоламинске рецепторе у медијалном префронталном кортексу (мПФЦ) и хипокампусу, као и сигнализацију митогеном активираних протеин киназа (МАПК) и фосфоинозитид-3-киназу (ПИЗК) сигнализацију у ове две структуре мозга пацова оба пола хронично

излаганих непредвидивим стресорима. Улога ендоканабиноида процењивана је применом УРБ597, инхибитора ензима хидролазе маснокиселинског амида, који разграђује ендоканабиноиде. Ова докторска дисертација обухвата седам уобичајених поглавља.

У првом поглављу, **УВОД**, кандидаткиња **Милица Јанковић** је кроз шест целина које су поткрепљене са десет илустрација, дала детаљан преглед података из научне литературе који описују релевантна сазнања повезана за предметом истраживања докторске дисертације. У оквиру **прве целине (Депресија)** на прегледан и систематичан начин кандидаткиња је приказала опште одлике депресије као болести са освртом на релевантне статистичке податке и терапије, као и проблеме у лечењу те болести. У оквиру ове целине, кандидаткиња је дала и приказ и објашњење неких од хипотеза о механизмима настанка и патофизиологије депресије. У оквиру **друге целине (Анимални модели депресије)** кандидаткиња је објаснила разлоге због којих је неопходно коришћење анималних модела депресије приликом изучавања ове болести, критеријуме које би анимални модели требало да задовоље, као и карактеристике модела хроничног непредвиог стреса, који је коришћен у докторској дисертацији. У **трећој целини (Региони мозга кључни за развој/испољавање депресије)**, кандидаткиња је описала опште неуроанатомске карактеристике мПФЦ и хипокампуса, као и истраживања која указују на њихов значај у депресији. У **четвртој целини (Катехоламински систем)**, кандидаткиња је на прегледан и систематичан начин описала опште карактеристике катехоламина, са освртом на биосинтезу, ослобађање, механизам деловања, карактеристике катехоламинских рецептора, инактивацију и разградњу катехоламина. Кандидаткиња је укратко приказала и литературне податке о функцији катехоламинског система у стресу. У **петој целини (Митогеном активирани протеин киназе (МАПК) и фосфоинозитид-3-киназа/ алфа серин/треонин-протеин киназа (ПИЗК/Акт) сигнални пут)** је детаљно описана активација МАПК и ПИЗК сигналних путева, као и њихова потенцијална улога у патофизиологији депресије. **Шеста целина (Ендоканабиноиди)** описује историју истраживања ендоканабиноидног система,

његове компоненте, односно лиганде, њихове рецепторе, процесе синтезе ендоканабиноида, механизам њиховог дејства, инактивације и разградње. Кандидаткиња даје посебан осврт на улогу који ендоканабиноидни систем има у депресији. У уводном делу постављене су полазне основе на које ће се ауторка ослањати у дискусији добијених и приказаних резултата у оквиру ове докторске дисертације.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** кандидаткиња је довела у међусобну везу чињенице изнете у уводном поглављу и на основу њих дефинисала општи циљ ове докторске дисертације – испитивање утицаја ендоканабиноида на различите путеве патогенезе депресије у мПФЦ и хипокампусу хронично стресираних пацова оба пола.

У складу са општим циљем, кандидаткиња је дефинисала шест специфичних циљева - да се код пацова оба пола излаганих хроничним непредвидивим стресорима (ЦУС) испита дејство УРБ597 на: 1. понашање мужјака и женки контролних пацова и пацова изложених хроничном непредвидивом стресу; 2. ниво норадреналина и допамина у мПФЦ и хипокампусу контролних пацова и пацова изложених хроничном непредвидивом стресу код оба пола; 3. количину ензима који учествују у промету катехоламина: тирозин хидроксилазе (ТХ), допамин бета хидроксилазе (ДБХ), моноамин-оксидазе А (МАО-А) и катехол-О-метил трансферазе (ЦОМТ) у мПФЦ и хипокампусу контролних пацова и пацова изложених хроничном непредвидивом стресу код оба пола; 4. количину Д1 и Д2 допаминских, и β 2-адреналинских рецептора у мПФЦ и хипокампусу контролних пацова и пацова изложених хроничном непредвидивом стресу код оба пола; 5. количину проинфламаторних цитокина ИЛ-1 β и ИЛ-6, као и антиинфламаторног цитокина ИЛ-10 у мПФЦ и хипокампусу мужјака и женки контролних пацова и пацова изложених хроничном непредвидивом стресу; 6. МАПК и ПИЗК сигналне путеве у мПФЦ и хипокампусу контролних пацова и пацова изложених хроничном непредвидивом стресу код оба пола.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ** састоји се од девет потпоглавља у којима су прегледно описане све експерименталне процедуре, са свим детаљима који су

неопходни да би се оне могле репродуковати. У оквиру **прве целине** наведено је да су коришћени 11 недеља стари пацови соја *Wistar* оба пола и детаљно је описан поступак руковања експерименталним животињама. У **другој целини** је објашњена коришћена доза и описана припрема раствора УРБ597, док је у **трећој целини** детаљно наведен и схематски приказан дизајн експеримента на Слици 12. У оквиру **четврте целине** објашњен је експериментални поступак хроничног излагања пацова непредвидивим стресорим. У оквиру **пете целине** су детаљно описани примењивани тестови понашања: тест принудног пливања (Слика 13), тест отвореног плус лавиринта (Слика 14) и тест препознавања новог објекта (Слика 15). **Шеста целина** описује одређивање концентрације катехоламина у хипокампусу и мПФЦ ELISA методом, док **седма целина** описује примену ELISA методе за одређивање концентрације интерлеукина у испитиван ткивима мозга. У **осмој целини** су у оквиру шест подцелина детаљно објашњене процедуре припреме узорака, извођење имунохемијске методе Western blot и поступак при семи-квантитативној анализи добијених имунореактивних трака. **Девета целина** описује поступак статистичке анализе добијених експерименталних резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** подељено је на пет целина. Поред наративно изнетих резултата, они су дати и као графички прикази, груписаних у 15 слика и праћени адекватним описима.

Прва целина укључује резултате који описују утицај УРБ597 на понашање хронично стресираних пацова оба пола на тесту принудног пливања, тесту отвореног плус лавиринта и тесту препознавања новог објекта. У **другој целини** изнети су резултати утицаја на ниво проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у мПФЦ и хипокампусу пацова излаганих ЦУС. У оквиру **треће целине** представљени су резултати који се односе на испитивање утицаја УРБ597 на концентрацију норадrenalина и допамина, експресију ензима биосинтезе катехоламина ТХ и ДБХ, ензима биоразградње катехоламина MAO-A и ЦОМТ, и на експресију Д1- и Д2-допаминских и β 2-адrenalинских рецептора у мПФЦ и хипокампусу пацова оба пола излаганих ЦУС. Резултати приказани у **четвртој целини** су показали како хронични

стрес и третман утичу на активацију ЕРК1/2 и p38 сигналних модула МАПК сигналног пута у мПФЦ и хипокампусу мужјака и женки пацова излаганих ЦУС. У **петој целини** су приказане промене у активацији ПИЗК/Акт сигналног пута изазване хроничним стресом и двонедељним третманом УРБ597 у мПФЦ и хипокампусу пацова оба пола.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** је организовано у четири целине, у складу са добијеним и описаним резултатима истраживања. Кроз та потпоглавља, кандидаткиња на сажет и јасан начин резимира резултате свог истраживања и, критички их поредећи са резултатима других релевантних истраживања, објашњава њихов значај и допринос.

У **првој целини**, кандидаткиња је текстуално обликовала критичку дискусију везану за дејство УРБ597 на параметре процене испољавања понашања налик депресивном и анксиозном код пацова оба пола излаганих ЦУС, као и на њихову радну, краткорочну и дугорочну меморију. Експериментални резултати су показали да након излагања животиња хроничном непредвидивом стресу долази до развоја облика понашања налик анксизном и депресивном који су били израженији код пацова женског пола. Двонедељна апликација УРБ597 показује антидепресивно и анксиолитичко дејство израженије код мужјака. Животиње изложене стресу показују полно специфичне дефекте у радној, краткорочној и дугорочној меморији, док УРБ597 третман позитивно, полно-специфично утиче на меморију стресираних пацова.

У **другој целини**, кандидаткиња је анализирао и дискутовала дејство УРБ597 на ниво катехоламина, експресију ензима њихове синтезе, разградње и катехоламинских рецептора. Ниво норадrenalина је био смањен у мПФЦ и хипокампусу пацова оба пола након шестонедељног излагања хроничном непредвидивом стресу као последица смањене синтезе и повећане разградње, док су промене у количини допамина код стресираних животиња биле полно-специфичне и специфичне за регион мозга. Третман УРБ597 стресираних животиња је повећао концентрације норадrenalина у обе структуре мозга само код животиња мушког пола, што је вероватна последица његовог дејства на експресију ензима биосинтезе катехоламина

у мПФЦ и на ензиме разградње катехоламина у обе структуре мозга само код мужјака. Поред тога, УРБ597 је ублажио повећање концентрације допамина у мПФЦ животиња оба пола, и полно и регионално специфично повећао експресију β 2-адреналинског рецептора Д1-рецептора у испитиваним структурама мозга. Кандидаткиња закључује да ендоканабиноиди делују полно-специфично на промет катехоламина.

У **трећој целини** кандидаткиња разматра дејство УРБ597 на ниво проинфламаторних цитокина ИЛ-1 β и ИЛ-6 и антиинфламаторног цитокина ИЛ-10 у мПФЦ и хипокампусу пацова изложених ЦУС. Резултати су показали да излагање пацова ЦУС доводи до повећања нивоа ИЛ-6 и ИЛ-1 β у мПФЦ животиња оба пола, док је концентрација ИЛ-6 и ИЛ-1 β била повишена у хипокампусу мужјака, а анализа ткива хипокампуса женки је показала повећање нивоа само ИЛ-6. УРБ597 је испољио антиинфламаторно дејство, смањивши ниво ИЛ-6 у хипокампусу, као и ниво ИЛ-1 β у мПФЦ и хипокампусу стресираних животиња оба пола.

У последњој, **четвртој целини**, кандидаткиња коментарише дејство УРБ597 на МАПК и ПИЗК сигналне путеве у мПФЦ и хипокампусу животиња оба пола. Статистичка анализа добијених резултата је показала да је излагање ЦУС довело до смањене фосфорилације ЕРК1/2 сигналног молекула у мПФЦ пацова оба пола и хипокампусу женки. УРБ597 је повећао фосфорилацију ЕРК 1/2 у мПФЦ стресираних пацова оба пола и у хипокампусу стресираних мужјака. Резултати студије су показали повећану активацију п38 сигналних молекула у мПФЦ пацова изложених ЦУС и у хипокампусу ЦУС женки. УРБ597 је смањио фосфорилацију п38 у мПФЦ стресираних пацова оба пола и хипокампусу женки изложених ЦУС. Кандидаткиња закључује да третман УРБ597 на полно-специфичан начин регулише МАПК сигнални пут у мозгу хронично стресираних пацова. Поред тога, резултати показују да хронично излагање пацова непредвидивим стресорима доводи до смањења фосфорилације Акт сигналног молекула у мПФЦ и хипокампусу пацова оба пола, док третман УРБ597 повећава активацију овог сигналног молекула само у хипокампусу пацова оба пола изложених ЦУС.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња је јасно и концизно сумирала закључке који су у потпуности произашли из добијених резултата, а одговорили су на постављене циљеве ове докторске дисертације.

У овој докторској дисертацији је показано да је код хронично стресираних пацова оба пола третман УРБ597 испољио антидепресивно и анксиолитичко дејство израженије код мужјака као и позитивне, полно-специфичне ефекте на меморију. Третман УРБ597 је ублажио повећање концентрације допамина код стресираних пацова оба пола и нормализовао концентрацију норадреналина код мужјака у мПФЦ и хипокампусу. Двонедељна апликација УРБ597 је полно специфично деловала на експресију ензима биосинтезе и разградње катехоламина као и на катехоламинске рецепторе у испитиваним структурама мозга код пацова изложених ЦУС. Коришћени третман је испољио антиинфламаторно дејство у мозгу стресираних пацова, смањивши концентрацију ИЛ-6 у хипокампусу пацова оба пола и експресију ИЛ-1 β у обе испитиване мождане структуре животиња оба пола. Хронични третман УРБ597 је нормализовао активацију МАПК сигналног пута у мозгу пацова изложених ЦУС, повећававши фосфорилацију ЕРК1/2 у мПФЦ пацова оба пола и хипокампусу мужјака и смањивши фосфорилацију p38 у мПФЦ пацова оба пола и хипокампусу женки. Такође, УРБ597 третман је деловао специфично за регион мозга на ПИЗК/Акт сигнални пут тако што је повећао активацију Акт1/2/3 само у хипокампусу стресираних пацова оба пола.

На основу свега изложеног закључено је да резултати ове докторске дисертације представљају значајан допринос разумевању механизма и полних разлика антидепресивног дејства ендоканабиноида, што је од изузетне важности за развој нових терапијских приступа у лечењу депресије.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи листу од 553 цитиране библиографске јединице које су релевантно изабране и адекватно коришћене приликом писања докторске дисертације.

Радови из докторске дисертације:

Б1. РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У НАУЧНИМ ЧАСОПИСИМА МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА

М21- РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ВРХУНСКИМ ЧАСОПИСИМА

1. **Jankovic, M., Spasojevic, N., Ferizovic, H., Stefanovic, B., & Dronjak, S. (2020).** Inhibition of the fatty acid amide hydrolase changes behaviors and brain catecholamines in a sex-specific manner in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiology & Behavior*, 227, 113174. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113174>

ИФ = 2.826

Psychology, Biological 4/14

2. **Jankovic, M., Spasojevic, N., Ferizovic, H., Stefanovic, B., Virijevec, K., Vezmar, M., & Dronjak, S. (2023).** Sex-Related and Brain Regional Differences of URB597 Effects on Modulation of MAPK/PI3K Signaling in Chronically Stressed Rats. *Molecular Neurobiology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03649-5>

ИФ= 5.686

Neurosciences 69/275

М23 - РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У МЕЂУНАРОДНИМ ЧАСОПИСИМА

1. **Jankovic, M., Spasojevic, N., Ferizovic, H., Stefanovic, B., & Dronjak, S. (2022).** Sex specific effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on memory and brain β 2-adrenergic and D1-dopamine receptors. *Neuroscience Letters*, 768, 136363. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136363>

ИФ= 3.197

Neurosciences 182/275

Б2. САОПШТЕЊА СА МЕЂУНАРОДНОГ СКУПА ШТАМПАНА У ИЗВОДУ

1. **Jankovic M., Ferizović H., Spasojević N., Stefanović B., Dronjak S.,** Anxiolytic properties of endocannabinoids on gender-related differences observed in rat behavior after chronic stress, Book of abstracts BYNS2018, pp. 27 - 27, Barselona, 13. - 14. Sep, 2018.
2. **Janković M., Ferizović H., Spasojević N., Stefanović B., Dronjak S.,** The sex differences in the effects of endocannabinoids on anxiety-like behaviour in chronically stressed rats, Current trends in physiological sciences:from cell signals to the biology of aging, pp. 123 - 123, Nis, Republic of Serbia, 19. - 23. Sep, 2018.

3. **Janković M.**, Ferizović H., Spasojević N., Stefanović B., Dronjak S., Differential effects of URB 597, a selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase, on noradrenaline turnover in prefrontal cortex and hippocampus of chronically stressed rats. FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, 2019.
4. **Janković M.**, Ferizović H., Spasojević N., Stefanović B., Virijević K., Dronjak S., Fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 shows antidepressant effects through reduction of neuroinflammation and restoration of BDNF levels in mPFC of chronically stressed rats, 8th Congress of Serbian neuroscience society with international participation, 31 May – 2 June 2023., Belgrade, Serbia

СОФТВЕРСКА ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертације кандидаткиње **Милице Јанковић** послата је дана 25.3.2024. године на софтверску проверу оригиналности, а извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 25.3.2024. Након провере оригиналности докторске дисертације **Милице Јанковић** под насловом „**Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије**“, коришћењем програма iThenticate у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“, Извештај је показао индекс сличности од 9%. Анализом извештаја утврђено је да је степен подударности текста последица библиографских података о коришћеној литератури, цитата и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из докторандове дисертације. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударање нису повезани и немају смисао.

Све наведено је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње **Милице Јанковић** те је настављен прописани поступак припреме за њену одбрану.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију под насловом: „**Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије**“, Комисија констатује да је докторска дисертација **Милице Д. Јанковић**, оригиналан научни рад, написан у складу са образложењем наведеним у пријави теме и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. У овој докторској дисертацији коришћене су савремене експерименталне методе, а истраживања су обављена по свим критеријумима научно-истраживачког рада. Резултати истраживања добијени у оквиру ове дисертације по први пут дају релевантне податке о специфичном ефекту третмана УРБ597 на промет катехоламина, инфламацију и МАПК и ПИЗК сигналне путеве у мПФЦ и хипокампусу у условима депресије.

Милица Д. Јанковић, истраживач сарадник, је овом докторском дисертацијом показала висок степен компететности и аналитичности, као и смисао за комплексне истраживачке приступе. Комисија је мишљења да докторска дисертација **Милице Д. Јанковић** са добро постављеним циљевима, методолошким поступцима, добијеним резултатима и њиховим тумачењем, пружа значајан оригинални допринос разумевању ефеката ендоканабиноида у патофизиологији депресије. У прилог актуелности проблематике и значају добијених резултата говори и чињеница да су резултати ове докторске дисертације објављени у три научна рада у часописима међународног значаја (два рада М21, и један рад М23 категорије са кумулативним импакт фактором од 11,709), као и да су представљени у виду четири саопштења на међународним научним скуповима.

Стога, имајући увид у целокупну истраживачку активност кандидаткиње и значај постигнутих резултата, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације под насловом **„Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије“**.

У Београду,

2. 4. 2024. год.

КОМИСИЈА:

др Наташа Спасојевић Поповић, виши научни сарадник,
Институт за нуклеарне науке „Винча”
Институт од националног значаја за Републику Србију
Универзитет у Београду;

др Ива Лакић, доцент,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Мирослав Аџић, научни саветник,
Институт за нуклеарне науке „Винча”
Институт од националног значаја за Републику Србију
Универзитет у Београду