

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -
БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној **12.7.2024.** године, на основу молбе ментора, **др Иване Бјелобабе**, научног саветника Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, и **др Данијеле Лакете**, ванредног професора Универзитета у Београду – Биолошког факултета одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације мастер биолога **Ане А. Милошевић**, истраживача – сарадника Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију под насловом: „**Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола**“, у саставу: **др Марија Јањић**, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, **др Предраг Вујовић**, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, и **др Иван Пилиповић**, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Ане А. Милошевић** под насловом „**Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола**“, написана је на 115 страна и садржи следеће основне целине: Увод (29 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (14 страна), Резултати (31 страна), Дискусија (11 страна), Закључци (2 стране), Литература (27 страна). Дисертација садржи 11 слика у оквиру поглавља Увод; 5 табела у оквиру поглавља Материјал и методе; 3 табеле и 28 слика (које представљају приказ оригиналних резултата истраживања кандидаткиње) у склопу поглавља Резултати и 388 референци у оквиру поглавља Литература. Дисертација садржи и насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са

информацијама о менторима и члановима комисије (1 страна), захвалницу (2 стране), сажетке на српском и енглеском језику са кључним речима (2 стране), листу скраћеница (3 стране) и садржај (3 стране). У оквиру прилога се налазе: Биографија ауторке, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет истраживања ове докторске дисертације био је испитивање функционалности компонената хипоталамо-хипофизно-гонадне (енгл. *hypothalamic-pituitary-gonadal*, HPG) осе током експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ), који представља анимални модел за изучавање мултипле склерозе (МС), код оба пола пацова *Dark Agouti* (ДА) соја.

У поглављу **Увод**, које садржи четири главна потпоглавља, на систематичан и детаљан начин изнет је преглед научних чињеница кључних за предмет проучавања докторске дисертације, које указују на оправданост и значај спроведених истраживања. У првом потпоглављу, под насловом *Мултипла склероза* описане су епидемиолошке карактеристике и основни фактори ризика за настанак ове болести. Дат је преглед клиничких типова МС, као и патофизиолошких процеса који доводе до појаве симптома. Описане су и две супротстављене хипотезе о настанку болести. Посебан одељак у овом потпоглављу посвећен је анималним моделима МС, где је дат преглед најчешће употребљаваних начина за моделовање болести – вирусима, токсинима и имунизацијом, и њихов значај за разумевање различитих аспеката патологије МС. У потпоглављу *Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис* детаљно је образложен значај овог модела за изучавање МС. Наведени су најчешће коришћени сојеви глодара и начини индукције болести, а посебно је описано изазивање ЕАЕ активном имунизацијом, која је употребљена и у истраживањима описаним у овој дисертацији. У овом потпоглављу је описана је улога CD4⁺ Т лимфоцита, антиген-презентујућих ћелија, као и микроглије и астроцита, у патогенези болести. У посебној целини на крају овог потпоглавља, описане су сличности и разлике између МС и ЕАЕ, односно предности и недостаци ЕАЕ модела. У потпоглављу *Хипоталамо-хипофизно-гонадна оса* детаљно су описане њене појединачне компоненте и објашњена је регулација репродукције код сисара, са посебним освртом на пацова. Најпре је дат кратак преглед компонената ове осе – неурона хипоталамуса који секретују гонадотропин-ослобађајући хормон (енгл. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH), гонадотропа хипофизе који продукују лутеинизирајући хормон (ЛХ) и фоликулостимулишући хормон (ФСХ) и полних жлезда – тестиса и оваријума који продукују гамете и синтетишу полне хормоне. Затим је, у неколико одељака, дат детаљан опис ових компонената и контроле њихове функције. Описана је анатомска организација хипоталамуса пацова, а затим је објашњена морфологија и дистрибуција неурона који секретују GnRH. Потом је дат опис регулације ослобађања GnRH – истакнута је улога кисептинских неурона у овом процесу. У наредној целини описана је регулација синтезе и

секреције гонадотропина, у гонадотропима аденохипофизе, и истакнут значај сигнализације посредоване рецептором за GnRH (енгл. *gonadotropin-releasing hormone receptor*, GnRHR) за ове процесе. У наредном одељку описане су полне жлезде мужјака пацова. Дат је преглед грађе и морфологије тестиса пацова, а затим су посебно описане ћелије интерстичјума, са акцентом на Лајдигове ћелије које продукују тестостерон, као и макрофаге, који представљају најбројнију популацију имунских ћелија тестиса и у тесном су међузависном односу са Лајдиговим ћелијама. Затим је детаљно описан сложен ензиматски процес синтезе андрогена од холестерола, процес стероидогенезе, у Лајдиговим ћелијама. Истакнут је значај и улога стероидног акутног регулаторног протеина (енгл. *steroidogenic acute regulatory protein*, StAR) за регулацију овог процеса у свим стероидогеним ћелијама. Наведени су чланови две фамилије ензима који учествују у стероидогенези – цитохром P450-оксидазе (енгл. *cytochrome P450*, CYP фамилија ензима) и хидроксистероид-деhidрогеназе (HSD фамилија ензима). На крају ове целине је описана регулација ендокрине функције тестиса, са акцентом на примарну регулацију повратним спрегама. У последњој целини овог потпоглавља описане су полне жлезде женки пацова. Након детаљног описа грађе и морфологије оваријума, навођења типова фоликула и објашњења процеса фоликулогенезе, наведено је да се синтеза естрогена у фоликулима оваријума одвија по теорији „два гонадотропина-два типа ћелија“ која је и објашњена. Истакнуто је да је биохемијски процес синтезе естрогена од холестерола идентичан као за андрогене, уз последњи корак ароматизације. Такође, наведено је да након лутеинизације, ћелије жутог тела примарно синтетишу прогестерон. Затим је, као и код мужјака, описана регулација ендокрине функције гонада, са акцентом на примарну регулацију повратним спрегама. Овде је истакнуто да код женки пацова долази до цикличних промена на нивоу HPG осе, које диктирају цикличне промене на свим стероид-зависним органима женки и називају се еструсни циклус. На крају ове целине детаљно су описане промене током еструсног циклуса пацова на нивоу HPG осе и на нивоу епитела вагине током следећих фаза: проеструс, еструс, диеструс I и диеструс II. Ово потпоглавље садржи три микрографије и осам шема које илустративно допуњују текст. У потпоглављу *Полне разлике и улога полних хормона у MC и EAE-у*, изнети су литературни подаци који указују на полни диморфизам у преваленцији и појави симптома MC, као и у прогресији болести. Истакнуто је да се ове разлике уочавају у периодима изразитих физиолошких флукуација у нивоу женских полних хормона, што је поткрепљено примерима из литературе, али и да током болести долази до промена концентрација полних хормона у циркулацији. С тим у вези, наведени су подаци о употреби полних хормона у терапији за MC. У последњем делу овог потпоглавља дат је преглед полних специфичности у инциденцији и току EAE. Такође је истакнута улога полних хормона и важност гонадалног статуса при индукцији болести. Затим су описани бројни примери из литературе о терапијском потенцијалу полних хормона у EAE моделу. На крају су наведени доступни подаци о утицају EAE на HPG осу и истакнуто је да се мали број истраживања систематски бавио променама функционалности HPG осе у контексту EAE.

У поглављу **Циљеви** дефинисано је да је општи циљ ове докторске дисертације

испитивање промена које се дешавају на нивоу хипоталамуса, хипофизе и гонада током развоја ЕАЕ код мужјака и женки ДА пацова. Изложени су специфични циљеви путем којих ће општи циљ бити постигнут, а то су:

1. Испитати профил генске експресије главних медијатора инфламације и неуропептида који учествују у регулацији HPG осе у ткиву хипоталамуса у различитим фазама болести.
2. Утврдити статус гонадотропа хипофизе, утврђивањем временског профила експресије гена специфичних за гонадотропе и концентрације ЛХ у серуму.
3. Анализирати концентрације полних хормона у серуму и екстрактима гонада током развоја болести.
4. Утврдити динамику еструсног циклуса женки пацова као и статус гонада кроз анализу ткива оваријума и тестиса током развоја болести, као и анализе експресије гена и нивоа протеина стероидогене машинерије.
5. Испитати функционалност појединачних компонената HPG осе на врхунцу болести, применом адекватних третмана *in vivo*.

Поглавље **Материјал и методе**, које чине два потпоглавља, написано је прегледно и са довољно детаља неопходних за репродуковање експерименталних процедура. Потпоглавље *Материјал* чине две целине. Целина *Хемикалије* састоји се из пет табела у којима су наведени коришћени реагенси са подацима о произвођачима, затим састави раствора коришћених у експерименталним процедурама, листе прајмера и обележених проба коришћених у анализи експресије гена, као и листа примарних и секундарних антитела. У целини *Животиње* наведено је да су у раду коришћени мужјаци и женке пацова ДА соја, старости 9-12 недеља, узгајани у Одгајалишту експерименталних животиња Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. Наводи се и да су сва испитивања одобрена од стране Етичке комисије за заштиту добробити животиња Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ и Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (бројеви дозвола 323-07-05970/2020-05 и 323-07-01374/2021-05). У потпоглављу *Методе*, које се састоји из 18 целина, детаљно су описане експерименталне процедуре. У првој целини, насловљеној *Индукција и евалуација ЕАЕ-а*, описано је да је ЕАЕ изазван активном имунизацијом, интрадермалном инјекцијом хомогената кичмене мождине помешаног са комплетним Фројндовим адјувансом, након чега су животиње свакодневно прегледане уз процену симптома ЕАЕ и мерење телесне масе. Објашњено је да су животиње жртвоване у три временске тачке током развоја ЕАЕ: на почетку (атонија, Еа), врхунцу (парализа, Еп) и крају (Ек), док су здраве животиње чиниле контролну групу (физиолошка контрола, ФК). У овом одељку дефинисани су и параметри ЕАЕ: инциденција, почетак болести, трајање симптома, трајање парализе, максимална оцена болести и укупна тежина болести, који су анализирани из пет огледа на мужјацима и пет огледа на женкама. У одељку *Утврђивање фазе еструсног циклуса* описано је да је женкама пацова током огледа свакодневно узоркован вагинални брис, након

чега су препарати посматрани под светлосним микроскопом. Истакнуто је да су женке праћене две недеље пре имунизације а затим и током трајања експеримента, као и да су женке код којих је регистрован анеструс пре дана имунизације искључене из огледа. У одељку *Хормонски третмани* описане су процедуре третирања животиња. Наглашено је да су за све третмане коришћене ФК и Еп групе животиња. Пацови оба пола третирани су киспептином, односно Це-терминалним декапептидом киспептина (Кп10), као и и аналогом GnRH, бусерелин ацетатом (БА). Пацови су жртвовани сат времена након ових третмана. Да би се проверио стероидогени капацитет тестиса, мужјаци пацова из ФК и Еп група третирани су природним агонистом рецептора за ЛХ, хуманим хорионским гонадотропином (енгл. *human chorionic gonadotropin*, hCG), у две дозе: 100 интернационалних јединица (енгл. *international unit*, IU) и жртвовани су након 2 сата, и 10 IU и жртвовани су након 24 сата. У целини *Узорковање крви и ткива* поновљено је да су пацови жртвовани у три временске тачке дефинисане симптомима ЕАЕ, као и да је ФК група жртвована на крају експеримента. Наглашено је да су женке ФК, Еа и Ек група жтвоване у другом дану диеструса, док су женке Еп групе жртвоване у продуженом диестрису трајања најмање четири дана. Описано је да су пацови жртвовани у комори са растућом концентрацијом угљен-диоксида, након чега је пункцијом леве срчане коморе извучена крв. Потом су дисецирана ткива и органи од интереса и адекватно припремљени за даљу манипулацију. У потпоглављу *Изолација интерстицијалних ћелија тестиса* на прегледан начин описана је изолација ових ћелија и наведени су литературни подаци по узору на које је вршена ова процедура. Наведено је да су ћелије одвојене за изолацију рибонуклеинске киселине (РНК) и протеина. У потпоглављу *Изолација РНК* наведено је да је за изолацију укупне РНК из интерстицијалних ћелија тестиса и хипофиза коришћен комерцијално доступан комплет *RNeasy MiniSpin*, док је за изолацију РНК из ткива хипоталамуса, тестиса и оваријума коришћен раствор *TRIzol™*. У одељку *Реверзна транскрипција* описано је да је за синтезу комплементарне дезоксирибонуклеинске киселине, вршене комерцијално доступним комплетом за реверзну транскрипцију, коришћено 1 µg РНК. У одељку *Ланчана реакција полимеразе у реалном времену* описано је да је за анализу експресије гена коришћена метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) и затим су описани принципи ове методе, састав реакционе смеше у случају *SYBR green* технологије и састав у случају *Taqman* технологије, као и температурни услови којима су реакционе смеше излагане. Кандидаткиња наводи да је експресија гена од интереса квантификована $2^{-\Delta Ct}$ методом, при чему су као интерне контроле коришћени *Gapdh* или *Actb*, зависно од стабилности њихове експресије у сваком анализираном ткиву. У одељку *Изолација протеина* описано је да су протеини из ткива или интерстицијалних ћелија тестиса изоловани из спојених узорака из $n \geq 5$ животиња по групи, који су хомогенизовани у RIPA пуферу, подвргнути сонификацији и центрифугирању, након чега су издвојени супернатанти који садрже протеине. У одељку *Мерење концентрације протеина* наведено је да је концентрација протеина мерена комерцијалним комплетом. Одељак

Електрофоретско раздвајање протеина и вестерн блот обухвата детаљан опис припреме протеина за раздвајање на полиакриламидном гелу на основу молекулске масе и анализе нивоа протеина вестерн блот методом. Наведено је да су овом методом анализирани нивои протеина StAR, CYP11A1 и 3 β -HSD у интерстицијалним ћелијама тестиса и ткиву оваријума. Описано је да је квантификација протеинских трака урађена мерењем оптичке густине трака протеина од интереса у односу на оптичку густину интерне контроле, коју су представљали β -актин или укупни протеини. У одељку *Екстракција стероида из ткива* објашњено је да су стероиди екстраховани из ткива тестиса, оваријума и надбубрежних жлезда помоћу етра. Одељак *Ензимски имунотест* детаљно приказује принцип методе ензимског имунотеста (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) и описано је да су овом методом мерене концентрације хормона у серуму и екстрактима стероида. Наведено је да су мерене концентрације ЛХ, тестостерона, прогестерона, естрадиола и кортикостерона, ELISA комплетима набављеним од неколико произвођача, чија су упутства детаљно праћена. Наглашено је да су узорци серума третираних животиња, као и узорци стероида из гонада и надбубрежних жлезда, адекватно разблажени након оптимизације методе. У одељку *Припрема ткива за хистолошка и имунохистохемијска бојења* кандидаткиња описује да су изоловане гонаде фиксирани у Буеновом раствору након чега су подвргнуте даљим процедурама да би биле укалупљене у парафин до сечења на микротому, на дебљину од 7 μ m. У одељку *Хистолошка бојења ткивних пресека* описано је бојење хематоксилином и еозином, уз објашњење принципа овог рутинског хистолошког бојења. У следећој целини, наслова *Морфометријска анализа ткивних пресека*, детаљно је описана метода морфометријске анализе ткива оваријума након бојења хематоксилином/еозином, уз навођење литературних података према којима је вршена класификација фоликула и жутих тела. У одељку *Имунохистохемијско и имунофлуоресцентно обележавање ткивних пресека* детаљно је описана процедура обележавања антигена од интереса на пресецима ткива. Зависно од тога да ли је визуелизација сигнала вршена помоћу хромогена или принципом флуоресценције, одређени кораци у овој експерименталној процедури су се разликовали, што је детаљно описано. У последњем одељку овог поглавља, *Статистичка обрада података и презентација резултата*, наведено је да је прво извршена анализа нормалне расподеле, Колмогоров-Смирновљевим тестом, као и анализа хомогености варијансе Лавиновим тестом. Будући да подаци нису задовољавали ова два услова, за анализу разлика између група коришћени су непараметријски статистички тестови – Крускал-Волисов тест праћен некоригованим Дановим *post hoc* тестом за анализу разлика између више група, односно Ман-Витнијев тест за анализу двеју група. Истакнуто је да је корелација између варијабли, анализирана у појединим случајевима, означена Пирсоновим коефицијентом корелације. Резултати су сматрани статистички значајним уколико је *p* вредност била мања од 0,05.

Поглавље **Резултати** уобличено је у 26 потпоглавља у којима су резултати систематично представљени у виду табела и слика са одговарајућим пропратним текстом и

позивом на одговарајућу табелу и/или слику. У првом потпоглављу представљен је ток ЕАЕ код животиња оба пола графицима који представљају просечну оцену симптома и просечну телесну тежину у периоду од 30 дана трајања експеримента и који су резултат анализе из пет огледа на мужјацима и пет огледа на женкама. У свим експериментима је показано да се код пацова оба пола развија ЕАЕ монфазног тока. Симптоматска фаза ЕАЕ код пацова оба пола била је праћена губитком телесне масе. У овом потпоглављу анализирани су и параметри ЕАЕ (инциденција, дан почетка болести, трајање симптома у данима, трајање парализе у данима, максимална оцена болести и укупна тежина болести) и показано је да су мужјаци имали већу максималну оцену болести, док је код женки болест почела раније. У другом потпоглављу представљена је динамика еструсног циклуса и показано је да је проценат животиња у фази диеструса у контролној групи био варијабилан у складу са нормалном динамиком еструсног циклуса, док је 100% имунизованих животиња било у фази диеструса током врхунца ЕАЕ. Уочена је позитивна корелација између просечног дана престанка симптома и дана поновног уласка у фазу проеструса. У трећем потпоглављу представљена је концентрација ЛХ у серуму током ЕАЕ и уочено је да је код мужјака концентрација овог хормона снижена у свим фазама болести, са тенденцијом враћања на ниво контролних вредности током опоравка, док је код женки снижена концентрација ЛХ регистрована само на врхунцу болести. Потпоглавље четири представља резултате експресије гена *Kiss1* и *Gnrh1* у хипоталамусу и показује да је током болести ниво *Kiss1* иРНК код мужјака непромењен, док је код женки значајно смањен у свим групама имунизованих животиња, с тим да је током опоравка од болести регистровано повећање експресије овог гена у односу на врхунац болести. Насупрот томе, код мужјака је забележено значајно смањење експресије *Gnrh1* у свим групама имунизованих животиња док код женки није регистрована промена експресије овог гена. У овом потпоглављу представљена је и експресија гена *Pdyn* и *Tac3* код животиња оба пола, али промена у нивоу иРНК није регистрована. У петом потпоглављу показана је експресија маркера инфламације (*Gfap*, *Vim*, *Cd68*, *Ccl2*, *Il1b* и *Spp1*) у ткиву хипоталамуса и утврђено је да је на почетку и/или врхунцу ЕАЕ повећана експресија испитаних гена код пацова оба пола. Потпоглавље шест показује образац експресије гена који кодирају гонадотропинске субјединице и *Gnrhr* у аденохипофизи. Утврђено је да је код женки ниво *Lhb* и *Cga* иРНК снижен само током врхунца болести, док је ниво *Fshb* иРНК повећан и на почетку и на врхунцу болести. Код мужјака није регистрована промена у експресији ових гена. Са друге стране, код женки је регистровано снижење нивоа *Gnrhr* иРНК на почетку и врхунцу болести, док је код мужјака снижење утврђено само на врхунцу. У потпоглављу седам приказан је ефекат *in vivo* третмана Кп10 и БА на концентрацију ЛХ у серуму. Показано је да се након третмана са Кп10, концентрација ЛХ у серуму није значајно разликовала између ФК и Еп група животиња. Међутим, након БА третмана регистровано је вишеструко повећање концентрације ЛХ у односу на одговарајуће БА-нетретирание групе животиња, с тим да је код мужјака концентрација ЛХ у серуму животиња на врхунцу болести након третмана и даље била значајно мања у односу на БА-третиране контролне животиње, док код женки

ова разлика није регистрована. У даљем приказу резултата до потпоглавља 17 представљени су резултати експеримената који су рађени на мужјацима. У осмом потпоглављу представљена је просечна маса тестиса, семених везикула, као и број интерстицијалних ћелија тестиса изражен по животињи и није утврђена разлика код имунизованих у односу на контролне животиње. Однос између масе тестиса и телесне масе указује на то да се губитак телесне масе уочен током симптоматске фазе ЕАЕ није одразио на масу тестиса. У потпоглављу девет показани су хистолошки прикази попречних пресека тестиса пацова ФК и Еп група на којима нису уочене морфолошке промене, као ни знаци инфламације. Потпоглавље десет приказује концентрацију тестостерона и његовог прекурсора, прогестерона, мерених у серуму мужјака током свих фаза болести. Показано је да је концентрација тестостерона током свих фаза болести снижена у односу на контролу, при чему је најнижа вредност регистрована на врхунцу болести. Током опоравка измерен је пораст концентрације тестостерона који ипак не достиже концентрацију регистровану код контролних животиња. Са друге стране, концентрација прогестерона у серуму била је значајно повећана на почетку болести, а повећање је било још израженије на њеном врхунцу. У потпоглављу 11 је показано да у интерстицијалним ћелијама тестиса долази до смањења нивоа *Insl3* иРНК током врхунца болести, а да је експресија гена који кодира рецептор за ЛХ, *Lhcgr*, инхибирана у свим фазама болести са смањењем инхибиције током опоравка у односу на врхунац ЕАЕ, али без достизања нивоа експресије контролних животиња. Потпоглавље 12 приказује резултате експресије гена компонената стероидогене машинерије (*Star*, *Scarb1*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1/2*, *Cyp17a1*, *Hsd17b3*) и ниво протеина појединих компонената (StAR, CYP11A1, 3 β -HSD). У складу са смањењем нивоа тестостерона у серуму, ниво иРНК за све испитиване компоненте био је зачашно снижен током почетка и/или врхунца ЕАЕ, осим нивоа *Hsd17b3* где промене нису регистроване. Смањење нивоа StAR и CYP11A1 регистровано је на врхунцу болести док промене у нивоу 3 β -HSD нису уочене током трајања болести. У оквиру потпоглавља 13, имунохистохемијским обележавањем протеина StAR на попречним пресецима тестиса контролних животиња и животиња на врхунцу болести, потврђено је смањено присуство овог протеина у интерстицијуму тестиса током врхунца ЕАЕ. У потпоглављу 14 табеларно су представљени резултати испитивања експресије маркера инфламације у ткиву тестиса где је показано да нема промене у експресији гена који кодирају *Tnfa*, *Ifng*, *Il1b* и *Il6*. Такође, имунохистохемијским бојењем је показано да нема промене у броју CD68-позитивних ћелија у интерстицијуму тестиса на врхунцу болести. У потпоглављу 15 приказана је концентрација прогестерона у узорцима стероида екстрахованих из тестиса и надбубрежних жлезда. Показано је смањење коцентрације овог хормона у тестисима на врхунцу болести, док је у надбубрезима концентрација овог хормона била повећана у свим фазама ЕАЕ. У потпоглављу 16 приказан је ефекат третмана са Кп10, БА и hCG на концентрацију тестостерона код контролних и животиња на врхунцу болести. Показано је да третмани са Кп10 и БА имају исти ефекат на концентрацију тестостерона као и на концентрацију ЛХ у серуму, док након третмана са hCG (100 IU/24 сата и 10 IU/24 сата)

није измерена разлика у концентрацији тестостерона у серуму између контролних и животиња на врхунцу ЕАЕ; концентрације тестостерона код hCG-третираних пацова биле су вишеструко веће у односу на групе нетретираних животиња. У наредном потпоглављу показано је да се разлике у експресији гена компонената стероидогене машинерије у интерстицијалним ћелијама изолованим из тестиса контролних и животиња на врхунцу болести, приказане у потпоглављу 12, губе након третмана са hCG, 10 IU/24 сата и/или 100 IU/24 сата. У даљем приказу резултата до потпоглавља 25 представљени су резултати експеримената рађених на женкама. Резултати представљени у потпоглављу 18 указују да је тежина изолованих оваријума смањена једино на врхунцу болести. Хистолошки приказ оваријума контролних и животиња на врхунцу ЕАЕ представљен у наредном потпоглављу не указује на постојање разлика између ових двеју група. Међутим, даљом морфометријском анализом забележен је знатно већи број атретичних/цистичних фоликула у оваријумима животиња на врхунцу болести. У потпоглављу 20 представљена је концентрација полних хормона у серуму женки и показано је да је концентрација прогестерона и тестостерона повећана на почетку и врхунцу ЕАЕ, док промене у концентрацији естрадиола нису уочене. Генска експресија и нивои протеина компонената стероидогене машинерије у ткиву оваријума приказани су у потпоглављу 21. Забележено је повећање експресије *Star* у оваријумима изолованим из све три групе имунизованих животиња, док је повећање експресије *Cyp11a1* било ограничено само на почетак, а *Scarb1* гена на врхунац болести. Повећање нивоа *Hsd3b1/2* и *Cyp19a1* иРНК регистровано је у оваријумима пацова на почетку и врхунцу болести. Ниво *Lhcgr* иРНК је повећан на почетку, а затим значајно смањен на врхунцу ЕАЕ. Насупрот томе, експресија *Cyp17a1* била је смањена на почетку и врхунцу болести, при чему је то смањење било израженије на врхунцу. Промене у експресији гена *Hsd17b1* и *Fshr* нису забележене. Даље, показано је значајно повећање нивоа StAR протеина у оваријумима изолованим из свих имунизованих животиња, с тим да је ниво овог протеина био значајно смањен код женки у опоравку у односу на женке на врхунцу ЕАЕ. Нису забележене промене у нивоу протеина CYP11A1 и 3β-HSD. У потпоглављу 22 представљени су резултати имунохистохемијског обележавања пресека оваријума на протеин StAR, изолованих из контролних и пацова на врхунцу ЕАЕ. Потврђени су претходни резултати и показано је да је интензитет обојености StAR-позитивних ћелија већи на пресецима оваријума женки на врхунцу болести. Имунофлуоресцентним обележавањем CYP17A1 испитано је присуство и овог ензима у потпоглављу 23. Представљене микрографије показују јасно обојене CYP17A1-позитивне ћелије на пресецима оваријума контролних женки, и то искључиво у ћелијама *theca interna* слоја фоликула, док у оваријумима изолованим из животиња на врхунцу ЕАЕ нису уочене CYP17A1-позитивне ћелије. У потпоглављу 24 представљене су концентрације полних хормона у екстрактима стероида изолованим из оваријума, док је у потпоглављу 25 представљена концентрација прогестерона измерена у екстрактима стероида из надбубрежних жлезда. Резултати показују да је концентрација прогестерона у оваријумима животиња на врхунцу ЕАЕ повећана. С друге стране, концентрација тестостерона је

смањена у оваријумима животиња на почетку и врхунцу болести, док је смањење концентрације естрадиола у оваријумима уочено само на врхунцу ЕАЕ. Концентрација прогестерона у надбубрежним жлездама женки није се мењала током болести. У последњем потпоглављу, 26, приказана је концентрација кортикостерона у серуму пацова оба пола, где је констатован пораст концентрације овог хормона само код мужјака, и то у свим фазама болести, док код женки нису регистроване промене током ЕАЕ.

Поглавље **Дискусија** је организовано је у виду једне целине. Кандидаткиња на почетку овог поглавља истиче значај истраживања промена у функционисању репродуктивног система током неуроинфламаторних процеса. Потом, на систематичан начин дискутује полне разлике у манифестацији и току болести, те измене у динамици еструсног циклуса, уз коришћење релевантне литературе. Затим су дискутоване и јасно повезане промене на нивоу хипоталамуса, хипофизе и гонада током болести у односу на постојећа истраживања како у контексту ЕАЕ, тако и у МС. У овом поглављу, кандидаткиња показује широко познавање научне литературе релевантне за области истраживања докторске дисертације и на систематичан начин сумира резултате свог истраживања. Кандидаткиња са посебном пажњом дискутује инфламаторне промене у хипоталамусу, које могу бити узрок свих уочених промена у функцији НРГ осе оба пола. Међутим, способност кандидаткиње да критички анализира своје резултате огледа се и у предлагању више од једног могућег објашњења. На пример, промене у динамици еструсног циклуса кандидаткиња повезује са инфламаторним променама у хипоталамусу и са енергетским метаболизмом. Детаљно се дискутује значај резултата који се односе на концентрације полних хормона у серуму, са упоредним освртом на студије које су рађене на пацијентима са МС. С тим у вези, истиче се да код мужјака, као и код мушкараца, долази до смањења концентрације тестостерона у серуму. Потом дискусија прелази на тумачење феномена уочених на нивоу гонада, у смислу промене експресије гена и нивоа протеина компонената стероидогене машинерије. Посебно је интересантан статус гонада код женки, који ауторка дискутује као стање слично псеудотрудноћи, уз навођење литературних података који подржавају овакву тврдњу. Дакле, уз способност критичког сагледавања резултата, кандидаткиња је показала способност да својим резултатима да шири контекст и представи њихов значај и научни допринос.

У поглављу **Закључци**, кандидаткиња је, у складу са постављеним циљевима, а на основу резултата изложених у докторској дисертацији и њихове анализе у контексту релевантних и актуелних научних података, закључила следеће:

1. Код пацова ДА соја акутни ЕАЕ има монофазни ток који се по већини параметара не разликује између полова. Међутим, болест се раније развија код женки, док је максимална оцена тежине болести већа код мужјака.

2. Током ЕАЕ долази до смањења концентрације ЛХ у серуму пацова оба пола. Код женки је ово смањење пролазно и ограничено на врхунац болести, док се код мужјака уочава у свим испитиваним фазама, у складу са смањеном експресијом *Gnrh1* у хипоталамусу и смањеном концентрацијом тестостерона у циркулацији, такође у свим фазама ЕАЕ.
3. Током ЕАЕ код женки долази до пролазног застоја у фази диеструса, што је у складу са смањеном експресијом *Kiss1* у хипоталамусу и смањењем концентрације ЛХ у циркулацији и у корелацији је са смањењем телесне масе у симптоматској фази болести.
4. Промене у експресији гена за неуропептиде који регулишу функционисање НРГ осе, регистроване током ЕАЕ, јесу полно-специфичне: смањење *Kiss1*, али не и *Gnrh1*, уочено је у хипоталамусу женки, док је код мужјака регистровано смањење експресије *Gnrh1*, али не и *Kiss1*.
5. На почетку и на врхунцу ЕАЕ долази до повећања експресије гена за проинфламаторне медијаторе који указују на присуство инфламације у ткиву хипоталамуса животиња оба пола.
6. Промене у експресији гена који кодирају субјединице гонадотропина у аденохипофизи су полно-специфичне. Смањење експресије *Lhb* и *Cga*, а повећање експресије *Fshb*, уочено је само код женки, на врхунцу болести. С друге стране, експресија *Gnrhr* смањена је током ЕАЕ у аденохипофизи пацова оба пола, што указује на поремећај ослобађања GnRH из хипоталамуса.
7. Гонадотропи аденохипофизе на врхунцу ЕАЕ задржавају способност одговора на стимулацију GnRHR. Амплитуда овог одговора је мања код мужјака што указује на поремећај у синтези и/или складиштењу ЛХ.
8. Инхибиција експресије компонената стероидогене машинерије у интерстицијалним ћелијама тестиса на почетку и/или врхунцу болести није изазвана локалном инфламацијом.
9. На врхунцу болести тестиси задржавају капацитет максималног одговора стероидогене машинерије на стимулацију рецептора за ЛХ.
10. Повећање концентрације прогестерона у серуму женки у складу је са порастом концентрације прогестерона у екстрактима стероида оваријума, порастом експресије *Fshb* у аденохипофизи, порастом генске и протеинске експресије појединих компонената стероидогене машинерије и одржавањем жутих тела у оваријумима, што заједно са застојем у диеструсу указује на то да ЕАЕ доводи до стања сличног псеудотрудноћи.
11. Током симптоматске фазе ЕАЕ, у оваријумима долази до смањења експресије ензима CYP17A1, као и до смањења концентрације тестостерона и естрадиола у екстрактима

стероида из ових гонада. Упркос томе, долази до повећања концентрације тестостерона у циркулацији женки током симптоматске фазе ЕАЕ.

12. Пораст концентрације прогестерона и кортикостерона у серуму мужјака резултат је појачаног рада надбубрежних жлезда.

Кандидаткиња је из свега наведеног извела генерални закључак да ЕАЕ акутног монофазног тока на пацовима ДА соја доводи до пролазних промена у функционисању НРГ осе које имају полно-специфичан образац на нивоу свих делова ове осе, и да, иако су појединачне промене на нивоу компонената ове осе полно-специфичне, заједничке одлике за мужјаке и женке пацова са ЕАЕ подразумевају инфламацију у хипоталамусу и пад концентрације ЛХ у серуму. Такође је закључено да ове промене за последицу имају застој у репродуктивном капацитету који би могао да представља адаптивни механизам у циљу очувања енергије што може допринети бржем опоравку од болести.

Поглавље **Литература** садржи 388 библиографских јединица. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Резултати ове докторске дисертације су публиковани у три рада у међународним часописима, од чега један рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и два рада у врхунским међународним часописима (M21). Кандидаткиња је део резултата своје дисертације изложила у виду три саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу (M34) и једног саопштења на скупу националног значаја штампаног у изводу (M64).

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Milošević, A.**, Janjić, M., Lavrња, I., Savić, D., Božić, I., Tešović, K., Jovanović, M., Peković, S., Stojilković, S. S., & Bjelobaba, I. (2020). The sex-specific patterns of changes in hypothalamic-pituitary-gonadal axis during experimental autoimmune encephalomyelitis. [Elsevier BV]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 89, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.025>
(M21a, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/191362>)
2. **Milošević, A.**, Bjelobaba, I., Božić, I., Lavrња, I., Savić, D., Tešović, K., Jakovljević, M., Stojilković, S. S., & Janjić, M. (2021). Testicular steroidogenesis is suppressed during experimental autoimmune encephalomyelitis in rats [Springer Science and Business Media LLC]. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88305-5>

(M21, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/450956>)

3. **Milošević, A.**, Lavrnja, I., Savić, D., Milošević, K., Skuljec, J., Bjelobaba, I., & Janjić, M. (2023). Rat Ovarian Function Is Impaired during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [Basel: MDPI]. *Cells*, 12 (7), 1045–1045. <https://doi.org/10.3390/cells12071045>

(M21, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/760650>)

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Milošević, A.**, Janjić, M., Lavrnja, I., Savić, D., Jakovljević, M., Peković, S., Bjelobaba, I., & Isaković, A. (2019). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Disturbs the Regulation of HPG Axis in Rats of Both Sexes. Book of Abstract: Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting; 2019 Jul 10-13; Belgrade, Serbia. Belgrade: Serbian Neuroscience Society. (M34, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/773073>)

2. **Milošević, A.**, Savić, D., Lavrnja, I., Milošević, K., Bjelobaba, I., Janjić, M., & Gotti, S. (2024). The Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Is Suppressed During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Male Rats. Abstract of Individual Lectures and Free Contributions: 12th International Meeting Steroids and Nervous System; 2024 Feb 24-27; Torino, Italy. Milan: Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari. (M34, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/898718>)

3. **Milošević, A.**, Janjić, M., Lavrnja, I., Savić, D., Milošević, K., Bjelobaba, I., & Gotti, S. (2024). Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Is Affected in Dark Agouti Rats With Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Abstract of Individual Lectures and Free Contributions: 12th International Meeting Steroids and Nervous System; 2024 Feb 24-27; Torino, Italy. Milan: Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari. (M34, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/898717>)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима националног значаја

1. **Milošević, A. A.**, Janjić, M. M., Lavrnja, I. Č., Peković, S. M., & Bjelobaba, I. M. (2019). Sex differences in the regulatory changes of HPG axis during experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. Abstract Book: 2nd Symposium in Biomedicine: Basic and Clinical Neuroscience; 2019 May 9; Belgrade, Serbia. Belgrade: Faculty of Pharmacy. (M64, <https://enauka.gov.rs/handle/123456789/472685>)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Ане А. Милошевић, Б3007/2016 послата је дана 12.7.2024. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 15.7.2024.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 12%. Подударност са Adžić, Marija. "The role of ecto-5'-nukleotidase (CD73) in inflammatory astrocyte activation and migration", Универзитет у Београду, Биолошки факултет, 2019 износи 1% (219 речи) а сви остали индекси подударности износе мање од 1%. Добијени индекси подударности односе се на лична имена, опште појмове и нашироко коришћене синтагме, називе, скраћенице цитокина и испитиваних молекула, називе реагенаса, широко коришћене скраћенице, коришћење стандардних израза из области истраживања. Наведена преклапања краћих делова појединих различитих реченица нису повезана и не чине смислену целину.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Ане А. Милошевић, под насловом "Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола", те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Након увида у докторску дисертацију кандидаткиње **Ане А. Милошевић**, под насловом „Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола“, као и увидом у научне публикације проистекле из ове докторске дисертације, Комисија закључује да приложена докторска дисертација представља оригинални научни допринос у изучавању хипоталамо-хипофизно-гонадне осе током експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса. Докторска дисертација представља веома комплексну, мултидисциплинарну студију. Кандидаткиња је показала поштовање основних етичких принципа и научних стандарда при извођењу експеримената и у изношењу резултата истраживања. Такође, показала је да је савладала велики број експерименталних метода које је користила у својим истраживањима, као и компетентност и критичност у интерпретирању и дискутовању резултата. Користила је релевантну начну литературу и показала да је успешно интегрисала стечено знање из области репродуктивне неуроендокринологије и ендокринологије у аутоимунским болестима, конкретно мултиплој склерози и експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису. Квалитет научних часописа у којима су објављени радови произашли из ове докторске дисертације недвосмислено говоре о њеном значају.

На основу свега претходно изложеног именована Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију под насловом: „Утицај експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса на хипоталамо-хипофизно-гонадну осу код *Dark Agouti* пацова оба пола“ и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета, да овај извештај прихвати и одобри **Ани А. Милошевић** јавну одбрану докторске дисертације.

У Београду, 19. 7. 2024. године

КОМИСИЈА:

др Марија Јањић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Предраг Вујовић, редовни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Иван Пилиповић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја за Републику Србију