

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 21.01.2022. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Горана Брајушковића о урађеној докторској дисертацији **Немање Љ. Вучића**, под насловом „**Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену NOS3 и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији**“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Иван Вуковић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду и др Зорана Добријевић, научни сарадник Института за примену нуклеарне енергије – ИНЕП Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и на основу овог прегледа и анализе Наставно-научном већу Универзитета у Београду-Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Немање Љ. Вучића** под називом „**Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену NOS3 и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији**“, написана је на 70 страна и садржи 23 слике (од којих је 20 оригинални резултат истраживања кандидата) и 24 табеле. Основне целине ове дисертације су Увод (11 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (15 страна), Резултати (26 страна), Дискусија (7 страна), Закључци (1 страна), Литература (6 страна; 104 референце), Прилози (3 стране). Дисертација садржи и насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са информацијама о менторима и члановима комисије (1 страна), захвалницу (1 страна), сажетке на српском и енглеском језику (2 стране), скраћенице (2 стране) и садржај (2 стране). На крају дисертације налазе се: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације кандидата **Немање Љ. Вучића** јесте испитивање асоцијација структурних варијанти хромозома Y, тандемски поновљене варијанте 4a/4b

у интрону гена *NOS3* и тачкастих варијанти у гену *NOS3* и у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву мушког стерилитета у популацији Србије.

У поглављу **Увод**, које садржи 4 потпоглавља, кандидат дефинише мушки стерилитет и на систематичан начин представљена досадашња сазнања о етиологији, дијагностици и лечењу мушког стерилитета. Посебна пажњу, затим, посвећује генетичкој основи мушког стерилитета. Описује улогу алела ниске пенетрабилности и варијација у броју копија хромозома Y у настанку стерилитета код мушкараца, и наводи значај студија асоцијације на читавом геному и студија асоцијације базираних на генима кандидатима за истраживања молекуларне патогенезе идиопатског стерилитета код мушкараца. На крају, описује механизме деловања оксидативног стреса на фертилност мушкараца посредством азот-моноксида који у ћелијама тестиса који настаје активношћу ензима азот-моноксид синтетазе 3 (*NOS3*).

У поглављу **Циљеви рада** кандидат је јасно дефинисао научне циљеве истраживања:

- Анализирати присуство генетичких промена по типу варијација у броју копија у оквиру региона *AZF* хромозома Y и испитати њихову могућу асоцијацију са ризиком за појаву мушког стерилитета.
- Испитати могућу асоцијацију тачкастих генетичких варијанти rs10842262, rs2477686 и rs12097821, одабраних на основу резултата студије асоцијације на читавом геному, са ризиком за појаву мушког стерилитета.
- Спровести мета-анализу асоцијације генетичких варијанти одабраних на основу резултата студија асоцијације на читавом геному и резултата претходних студија, са ризиком за појаву мушког стерилитета.
- Испитати могућу асоцијацију тачкастих генетичких варијанти rs1799983 и rs2070744, као и интронске варијанте 4a/4b у гену *NOS3* са ризиком за појаву мушког стерилитета.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата 2 потпоглавља и написано је са довољно детаља неопходних за репродуковање експерименталних метода.

У потпоглављу **Материјал** кандидат описује хумани узорак на коме је вршио истраживања. Наводи укупан број мушкараца укључених у ову докторску дисертацију (208 мушкараца са клиничком дијагнозом идиопатског стерилитета и 206 фертилних мушкараца који су чинили контролну групу), критеријуме коришћене током постављања клиничке дијагнозе идиопатског стерилитета (клинички преглед којим је искључено постојање познатих органских и психолошких узрока стерилитета, анализа спермограма и искљученост нумеричких аберација хромозома као узрока стерилитета), као и сагласност Етичких комитета болница у сарадњи са којима је ова студија спроведена. Наиме, ова докторска дисертација урађена је у сарадњи Центра за хуману

молекуларну генетику Универзитета у Београду – Биолошког факултета са Клиником за урологију Универзитетског клиничког центра Србије, Одељењем за неуробиологију, Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију и Центра за вантелесну оплодњу „Академик Војин Шуловић“ Опште болнице у Ваљеву.

У потпоглављу **Методe** детаљно су описане методе коришћене за изолацију геномске ДНК из узоракa периферне крви и букалних брисева, као и методе генотипизације одабраних генетичких варијанти: анализу полиморфизма у дужини рестрикционих фрагмената, анализу дужине амплификованих фрагмената агарозном гел електрофорезом и методу умножавања вишеструко лигираних проба. Затим су описани статистички тестови и софтверски пакети примењивани у сврху анализе асоцијација појединачних генетичких варијанти са ризиком за појаву мушког стерилитета, као и за спровођење мета-анализе која је укључивала резултате студија публикованих на другим популацијама. За статистичку обраду резултата генотипизације тачкастих варијанти коришћен је програм *SNPStats*. Приликом процене асоцијације генетичких варијанти са ризиком за појаву стерилитета тестирани су различити генетички модели, док је процена најадекватнијег генетичког модела вршена је на основу вредности *Akaike* информационог критеријума. Анализа хетерогености студија и мета-анализа спроведене су помоћу статистичког софтвера *OpenMeta-analyst*. Кохранов *Q* статистички тест коришћен је у комбинацији са одређивањем индекса недоследности за анализу хетерогености резултата студија. На крају, за статистичку обраду резултата генотипизације варијација у броју копија коришћен је Фишеров егзактни тест.

У поглављу **Резултати**, које је организовано у 10 потпоглавља, кандидат образложе специфичне детаља експерименталног приступа, наводи резултате експеримената и документује их сликама и табелама.

На основу клиничке дијагнозе стерилитета, анализирани мушкарци су подељени у две групе: мушкарци са олигоастенозооспермијом (смањен број и покретљивост сперматозоида) (114 особа; 54,8%) и мушкараци са азооспермијом без опструкције, која подразумева одсуство сперматозоида у ејакулату (94 особа; 45,2%). Просечна старост мушкараца са стерилитетом била је 32,42 година, док је у контролној групи износила 32,48 година.

Први део резултата генотипизације односи се на тачкасте варијанте хромозома 1 и 12 одабраних на основу студија асоцијације на читавом геному. Генотипизација генетичких варијанти хромозома 1 (rs12097821 и rs2477686) и хромозома 12 (rs10842262) урађена је на комплетном узорку. Анализом асоцијације генотипова и алела утврђено је да варијанта rs10842262 смањује ризик за појаву стерилитета према

овердоминантном и кодоминантном моделу, као и да мање учестали алел С варијанте rs2477686 смањује ризик за појаву олигоастенозооспермије.

Асоцијација варијанти rs10842262, rs12097821 и rs2477686 са ризиком за појаву мушког стерилитета према рецесивном и алелском моделу показана је мета-анализом пет претходно објављених студија које су задовољавале критеријуме за укључивање у мета-анализу. Имајући у виду да је међу пет одабраних студија била и студија асоцијације на читавом геному на основу које су одабране генетичке варијанте у хромозомима 1 и 12 и која је обухватила велики број испитаника, спроведена је и мета-анализа без наведене студије. Таква мета-анализа је потврдила је асоцијацију варијанти rs10842262 и rs2477686 са ризиком за појаву мушког стерилитета према рецесивном и алелском моделу. Прецизније, мање учестали алел G варијанте rs2477686 повећава ризик за појаву стерилитета код мушкараца. Истовремено показана је асоцијацију ове варијанте са ризиком за појаву азооспермије без опструкције. Такође, уочено је да је ова генетичка варијанта асоцирана је са мушким стерилитетом у групи испитаника из Азије. Мање учестали алел G варијанте rs10842262 асоциран је са повећаним ризиком за појаву мушког стерилитета. Такође, установљена је асоцијација ове варијанте са појавом мушког стерилитета код особа азијског порекла, као и асоцијација са појавом азооспермије без опструкције по рецесивном и алелском моделу.

Други део резултата односи се на испитивање одабраних варијанти гена *NOS3*. За потребе тестирања асоцијације тачкастих варијанти rs1799983 и rs2070744, као и интронске варијанте 4a/4b у гену *NOS3* са ризиком за појаву стерилитета, генотипизација је спроведена у подгрупи од 131 стерилног мушкараца и 131 фертилног мушкараца. Поређењем учесталости алела и генотипова испитиваних варијанти у гену *NOS3* није утврђена њихова асоцијација са ризиком за појаву стерилитета. Резултати добијени у оквиру ове тезе указују да је интронска варијанта 4a/4b гена *NOS3* асоцирана са повећаним ризиком за појаву стерилитета код мушкараца са смањеним бројем и смањеном покретљивошћу сперматозоида (олигоастенозооспермијом).

Последњи део представљених резултата односи се на идентификацију варијација у броју копија у оквиру региона *AZF* хромозома Y. Варијације у броју копија у региону *AZF* детектоване су код 24 од укупно 105 (22.86%) стерилних и код 11 од укупно 112 (9.82%) фертилних мушкараца. Међу њима детектовано је шест различитих дупликација, три различите делеције и један комплексни реаранжман који је настао инверзијом између r2 и r3 ампликона, након чега су уследиле дупликација између b2 и b3 ампликона и b3/b4 делеција. За све детектоване делеције у оквиру региона *AZF* показана је асоцијација са ризиком за појаву мушког стерилитета, као и асоцијација делеције *gr/gr* са ризиком за развој олигоастенозооспермијом.

У поглављу **Дискусија**, кандидат је логично и са мером интерпретирао и критички анализирао резултате. Такође, дискутовани их је у светлу резултата објављених студија, са посебним освртом на резултате студија спроведене у другим популацијама. Кандидат је тиме показао да је упознат са релевантном литературом. На крају поглавља критички се осврнуо и на главна ограничења ове студије дајући смернице за даља истраживања.

У поглављу **Закључци**, у складу са постављеним циљевима, јасно су резимирани резултати:

- Коришћењем методе умножавања вишеструко лигираних проба укупно је детектовано 10 типова варијација у броју копија у оквиру региона *AZF* хромозома Y, од тога 6 дупликација, три делеције и један комплексни реаранжман.
- На основу резултата Фишевог егзактног теста уочена је статистички значајна разлика у учесталости *gr/gr* делеције између стерилних мушкараца са ологоастенозоосперијом и фертилних контрола.
- Статистички значајан резултат добијен је након поређења учесталости свих делеција детектованих у оквиру региона *AZFc* између стерилних мушкараца и фертилних контрола, као и између мушкараца са дијагнозом олигоастенозоосперије и фертилних мушкараца.
- Генетичка варијанта 4a/4b асоцирана је са ризиком за појаву стерилитета код мушкараца из популације Србије са дијагнозом олигостенозоосперије (на основу овердоминантног генетичког модела).
- Статистички тренд значајности приликом тестирања асоцијације између генетичке варијанте rs2070744 и ризика за појаву стерилитета код мушкараца са олигоастенозоосперијом (на основу овердоминантног генетичког модела) и код мушкараца са НОА (на основу доминантног и лог- адитивног генетичког модела).
- Генетичка варијанта rs10842262 асоцирана је са ризиком за појаву стерилитета код мушкараца из популације Србије (на основу кодоминантног и овердоминантног генетичког модела). Иста варијанта асоцирана је са ризиком за појаву стерилитета код мушкараца из популације Србије са дијагнозом са азоосперије без опструкције (на основу кодоминантног, доминантног и овердоминантног генетичког модела).
- Генетичка варијанта rs2477686 асоцирана је са ризиком за појаву стерилитета код мушкараца из популације Србије са дијагнозом олигоастенозоосперије (на основу лог-адитивног генетичког модела).
- Након искључивања иницијалне студије асоцијације на нивоу читавог генома из мета-анализе, асоцијација rs2477686 са ризиком за појаву мушког стерилитета била је статистички значајна (на основу алелског и рецесивног генетичког модела). Статистички значајан резултат према алелском моделу добијен је за подгрупу студија које су укључивале мушкарце са дијагнозом олигоастенозоосперије. На основу истог генетичког модела добијен је статистички тренд значајности за

асоцијацију са ризиком за појаву стерилитета код мушкараца са азооспермијом без опструкције. Статистичка значајност постигнута је у групи мушкараца азијског порекла према алелском генетичком моделу.

- Након искључивања иницијалне студије асоцијације на нивоу читавог генома из мета-анализе, асоцијација rs10842262 са ризиком за појаву мушког стерилитета била је статистички значајна (на основу рецесивног и алелског генетичког модела). Статистичка значајност резултата била је присутна и у подгрупи случајева и контрола азијског порекла, као и у подгрупи стерилних мушкараца са дијагнозом азооспермије без опструкције.

У поглављу **Литература** кандидат је на прегледан начин приказао 104 цитирана рада који су на адекватан начин коришћена при писању дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Vučić NLJ**, Nikolić ZZ, Vukotić VD, Tomović SM, Vuković II, Kanazir SD, Savić-Pavićević DLJ, Brajušković GN. NOS3 gene variants and male infertility: Association of 4a/4b with oligoasthenozoospermia. *Andrologia* 2018; 50(1). doi: 10.1111/and.12817. (M22, IF₂₀₁₆=1.458, oblast: *Andrology*)
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/and.12817>
2. **Nemanja V**, Zorana D, Nevena K, Suzana M, Ivan V, Branko B, Mirka D, Dusanka SP, Goran B. Association study between single-nucleotide variants rs12097821, rs2477686, and rs10842262 and idiopathic male infertility risk in Serbian population with meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37(11):2839-52. doi: 10.1007/s10815-020-01920-5. (M21, IF₂₀₁₉=2,829, oblast: *Obstetrics & Gynecology*)
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-020-01920-5>
3. **Vučić N**, Kotarac N, Matijašević S, Radenković L, Vuković I, Budimirović B, Djordjević M, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Copy number variants within AZF region of Y chromosome and their association with idiopathic male infertility in Serbian population. *Andrologia* 2022; 54(1):e14297. doi: 10.1111/and.14297. (M23, IF₂₀₂₀=2,775, oblast: *Andrology*)
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/and.14297>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја:

1. **Vučić N**, Nikolić Z, Savić-Pavićević D, Kanazir S, Vukotić V, Romac S, Brajušković G. Assessment of possible association between two genetic variants in NOS3 gene and male infertility in Serbian population. Book of abstracts:131. V Congress of the Serbian Genetic Society. Kladovo (Belgrade). 28. 9. – 2. 10. 2014.

Провера оригиналности докторске дисертације

Коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације Немање Љ. Вучића. Извештај од 05.06.2022. годије показао је индекс подударности од 25%.

Увидом у Извештај утврђено је подударање са 77 извора.

Подударање са једним извором било је 9% - докторска дисертација Николић Зоране из 2017. године и са једним извором од 6% - докторска дисертација Бранковић Ане из 2014. године. Обе докторске дисертације за тему су имале молекуларно генетичку основу карцинома простате и обе су рађене под менторством Горана Брајушковића. У докторској дисертацији Бранковић Ане и Вучић Немање, поред осталог, анализирани су и две исте генетичке варијанте гена *NOS3*. Уочене подударности се односе на поглавље Материјал и методе: у називима потпоглавља, у називима коришћених метода и испитиваних генетичких варијанти, у називима коришћених хемикалија и китова, и кратким фразама уобичајеним у методолошким описима.

Са сваком од преосталих 75 извора подударање је било једнако или мање од 1%, изузев са једним извором које износи 2%. Подударања су се највећим делом односила на стандардно присутне делове докторских дисертација (навођење назива институција, уобичајених скраћеница, стручних термина, општих фраза, назива поглавља, назива примењених метода, уређаја, реагенаса и комерцијалних китова, захвалницу). Поред тога, уочено је делимично подударање и при описивању метода и процедура које се стандардно користе у молекуларној биологији или проистичу из упутства произвођача комерцијалних китова, као и при коришћењу терминологије при описивању методологије коришћене при статистичкој анализи података. Кандидат је приликом израде дисертације поштовао академска правила цитирања и навођења литературних извора.

Узимајући у обзир претходно наведено и Правилник о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду” број 201/18), извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Немање Љ. Вучића, под насловом „Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену *NOS3* и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог комисије

Докторска дисертација **Немање Љ. Вучића** представља оригиналан рад из области хумане молекуларне генетике и урађена је у складу са предлогом истраживања који је одобрен од стране Већа научних области природних наука Универзитета у Београду. Резултати ове докторске дисертације указују на значај варијација у броју копија у оквиру региона *AZF* хромозома Y у генетичкој предиспозицији за развој стерилитета (ологоастенозоосперије) код мушкараца из Србије. По при пут је детектован и један комплексни реаранжман у региону *AZF* хромозома Y. Такође је показано да је генетичка варијанта *4a/4b* у гену *NOS3* асоцирана са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца из Србије. Генетичке варијанте rs2477686 и rs10842262 (одабране на основу студије асоцијације на читавом геному) асоциране су са ризиком за појаву стерилитета код мушкараца са олигоастенозооспермијом и код мушкараца са азооспермијом без опструкције. Добијени резултат је потврђен и спроведеном мета-анализом. Кандидат је кроз резултате своје докторске дисертације дао допринос разумевању молекуларно генетичке основе идиопатског стерилитета код мушкараца. Резултати ове докторске дисертације објављени су у тру научна рада (категорија M21, M22 и M23) у којима је Немања Вучић први аутор.

На основу изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри **Немањи Љ. Вучићу** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену NOS3 и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији**“.

У Београду, 25. јануара 2022. године

КОМИСИЈА:

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Иван Вуковић, доцент
Универзитет у Београду – Медицински факултет

др Зорана Добријевић, научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за примену
нуклеарне енергије – ИНЕП