

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13. новембра 2023. године, на основу молбе ментора, **др Тање Јевђовић**, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду и **др Данијеле Војновић Милутиновић**, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Бојане Б. Мићић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду под насловом: **„Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичких јајника“**, у саставу: **др Јелена Ђорђевић**, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Буро Мацут**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду и **др Наташа Величковић**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду.

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 **Бојане Мићић**, под насловом: **„Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичких јајника“**, реализована у Одељењу за биохемију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, представља оригинални научни допринос кандидаткиње. Израда докторске дисертације је финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја (број уговора: 451-03-9/2021-14/200007), односно од стране Министарства науке, иновација и технолошког развоја Републике Србије, у склопу споразума о институционалном финансирању (бројеви уговора: 451-03-68/2022-14/200007 и 451-03-47/2023-01/200007). Све експерименталне процедуре одобрене су од стране Етичке комисије Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (евиденциони број дозволе: 01-02/19).

Докторска дисертација је написана на 88 страна и састоји се од следећих главних целина: Увод (25 страна), Циљ (1 страна) Материјал и методе (10 страна), Резултати (24 стране), Дискусија (12 страна), Закључци (2 стране) и Литература (14 страна, 136 литературних навода). Поред тога, садржи и непагиниране насловне стране на српском и енглеском језику (2 стране) које прати по једна празна страна, податке о менторима и члановима Комисије за преглед и оцену докторске дисертације (1 страна), захвалницу (3 стране), сажетке на српском и енглеском језику, са издвојеним кључним речима (2 стране), листу скраћеница коришћених у тексту дисертације (3 стране) и садржај (2 стране). 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

Прво поглавље ове докторске дисертације, УВОД, састоји се од четири потпоглавља у којима кандидаткиња, позивајући се на релевантне литературне податке, објашњава шири контекст у коме су резултати дисертације значајни.

У првом потпоглављу насловљеном *Синдром полицистичних јајника*, дефинисан је репродуктивни поремећај који је тема дисертације, описана еволуција дијагностичких критеријума који се користе у клиничкој пракси и дискутивани су различити патофизиолошки механизми који се узимају као могућа основа за развој синдрома полицистичних јајника. Са посебном пажњом су описане метаболичке промене које су карактеристичне за синдром полицистичних јајника, са акцентом на инсулинску резистенцију. На крају првог потпоглавља, објашњен је утицај гојазности у адолесцентској доби као фактор ризика за развој синдрома полицистичних јајника и изнети су најсавременији литературни подаци који указују на то да се овај синдром може развити као последица повећане телесне масе у овом критичном развојном периоду.

У другом потпоглављу под насловом *Бело масно ткиво* систематично је описана структурна организација и наведене су физиолошке функције белог масног ткива, са акцентом на метаболичке процесе који се одвијају у овом ткиву. Кандидаткиња је навела и патофизиолошке процесе до којих може доћи у различитим депоима белог масног ткива и описала њихов утицај на околне органе у зависности од анатомске позиције депоа масног ткива.

Треће потпоглавље Увода, под насловом *Скелетни мишићи* организовано је на сличан начин као и треће потпоглавље. Прво су описане структурна и функцијска организација скелетних мишића и биохемијски процеси на којима је заснован енергетски метаболизам у мишићном ткиву. Затим су описане патолошке промене које појединачно или у садејству могу да доведу до метаболичке дисфункције скелетних мишића, а посебна пажња је посвећена променама у сигналном путу инсулина, које

могу да доведу до резистенције на деловање овог хормона на нивоу мишићног ткива. Резистенција на инсулин на нивоу скелетних мишића може се јавити много раније него што су промене на системском нивоу уочљиве и често представља основу за развој бројних метаболичких поремећаја. Поред тога, поједини литературни подаци указују на то да постоје промене у сигналном путу инсулина у скелетним мишићима које су карактеристичне за инсулинску резистенцију специфичну за синдром полицистичних јајника.

Поглавље Увод завршава се четвртим потпоглављем – *Животињски модели у изучавању синдрома полицистичних јајника и повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду*. У првом делу овог потпоглавља кандидаткиња је објаснила које услове треба да задовољава животињски модел да би био релевантан за изучавање синдрома полицистичних јајника, затим и начине добијања најактуелнијих модела укључујући генетичке манипулације и третмане различитим хормонима у специфичним периодима индивидуалног развића, уз истицање предности и недостатака описаних модела. Посебно је нагласила значај животињских модела за досадашњи и будући напредак у разумевању етиологије и патогенезе синдрома полицистичних јајника и унапређењу терапијских приступа овом репродуктивном и метаболичком поремећају. Наведена су и ограничења која се морају имати у виду при коришћењу животињских модела. У другом делу су описани животињски модели умеренијег повећања телесне масе које настаје као последица измењеног неуроендокриног програмирања контроле апетита услед повећаног калоријског уноса током критичних перинаталних периода. Код глодара се повећани калоријски унос у раном постнаталном периоду, док мадунци сисају, лако постиже манипулацијом величине легла, при чему животиње које се до одвајања од мајки гаје у малим леглима уносе већу количину млека због смањене конкуренције за храну као и богатијег нутритивног састава млека њихових мајки у поређењу са онима које доје младунце из легала просечне величине. Показано је да је хиперфагија успостављена на овај начин трајна, односно да животиње које се гаје у леглима величине мање од просечног и по преласку на чврсту храну настављају да уносе већу количину калорија и одржавају већу телесну масу у односу на вршњаке гајене у леглима просечне величине.

У поглављу ЦИЉ, кандидаткиња је довела у међусобну везу чињенице изнете у уводном поглављу и на основу њих изнела општи циљ ове докторске дисертације – да се на утемељеном моделу синдрома полицистичних јајника који је изазван континуираним третманом 5 α -дихидротестостероном (ДХТ) испита допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду, постигнут смањењем величине легла, развоју метаболичких поремећаја удружених са синдромом.

У складу са општим циљем, кандидаткиња је дефинисала шест специфичних циљева који се односе на процену инсулинске осетљивости на системском нивоу и на биохемијске, хистолошке и молекуларно-биолошке анализе на нивоу висцералног и субкутаног масног ткива, као и скелетних мишића.

Поглавље МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ састоји се од дванаест потпоглавља у којима су систематично и прегледно описане све експерименталне процедуре, са свим детаљима који су неопходни да би се оне могле репродуковати.

У потпоглављу *Експериментални дизајн и третман животиња* наведено је да су коришћене младе женке пацова соја *Wistar*, те да се, због сукцесивног увођења третмана студија састоји из два дела: (1) формирање малих легала – чиме је уведен фактор повећаног калоријског уноса од другог дана старости; и (2) континуирани ДХТ третман – чиме је уведен и фактор хиперандрогенемije од 22. дана старости. У другом потпоглављу су детаљно описане процедуре за изоловање ткива коришћених у анализама и за припрему серума, док су у трећем описане биохемијске процедуре којима су утврђени физиолошки и биохемијски параметри на системском нивоу (процена инсулинске осетљивости на основу теста оптерећења глукозом и ХОМА индекса; одређивање гликолипидног статуса). У четвртм потпоглављу описане су процедуре припреме ткива јајника и депоа масног ткива за хистолошке анализе и начин извођења ових анализа. У наредна три потпоглавља су детаљно описане процедуре припреме узорака за анализу експресије молекула инсулинског сигналног пута, киназе коју активира аденозин-монофосфат (АМПК), сиртуина, перилипина, дисмутазе 2 супероксида *Western blot* методом, извођење методе и поступак при семи-квантитативној анализи добијених имунореактивних трака. Следи опис поступака који су претходили релативној квантификацији генске експресије и извођења ланчане реакције полимеразе у реалном времену (Стероил-СоА десатураза 1, Синтаза масних киселина, Карнитин палмитоил трансфераза 1, Транспортер масних киселина 1, Интерлеукини 1 β и 6, Хипоксантин-гуанин фосфорибозил трансфераза). У једанаестом потпоглављу је описана метода којом је процењен степен липидне пероксидације у узорцима скелетних мишића. Последње, дванаесто потпоглавље *Статистичка обрада података* садржи информације о изведеним статистичким анализама. Већина података је анализирана двофакторском анализом варијансе (*two-way ANOVA*). У случају да је детектована интеракција између тестираних фактора – смањене величине легла и ДХТ-третмана, међугрупна поређења су вршена Тукијевим *post hoc* тестом. Вредност $p < 0,05$ је сматрана статистички значајном.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ, кандидаткиња је прегледно приказала добијене резултате, које је груписала у четири потпоглавља. Поред наративно изнетих резултата, они су дати и као графички прикази, табеле и микрографије, праћене адекватним описима.

У оквиру првог потпоглавља *Карактеризација модела на основу биохемијских и физиолошких параметара*, изнети су резултати који потврђују да животиње гајене у малим леглима постижу значајно већу телесну масу осмог дана старости у односу на вршњакиње гајене у леглима просечне величине и да постигнуту разлику одржавају током живота, и након преласка на чврсту храну. Такође су изнети и морфолошки и хистолошки подаци који указују на дисфункционалност јајника, чиме је валидиран коришћени животињски модел. Следе резултати који говоре у прилог присуству хиперинсулинемије и нарушености системске осетљивости на инсулин код ДХТ-

третираних животиња гајених у малим леглима, упркос физиолошким вредностима концентрације глукозе.

Друго потпоглавље је посвећено резултатима анализа извршених у узорцима висцералног масног ткива. Хистолошка и морфометријска анализа овог ткива указују на то да и фактор смањене величине легла и ДХТ-третман доприносе хипертрофији адипоцита у овом депоу масног ткива. Упркос томе, на основу мерења експресије протеина сигналног пута инсулина (супстрат инсулинског рецептора 1, протеин киназа Б и киназа регулисана екстрацелуларним сигнаlima), смањење осетљивости на инсулин у овом депоу масног ткива није детектовано. На основу мерења релативне експресије гена за ацетил-СоА-карбоксилазу, синтазу масних киселина и стеароил-СоА-десатуразу, кандидаткиња тврди да постоји супресија *de novo* липогенезе у свим експерименталним групама у поређењу са нетретираним животињама гајеним у малим леглима.

Релативна експресија гена за липазу осетљиву на хормоне је била под утицајем интеракције оба испитивана фактора, док *post hoc* тест показује значајно смањену експресију овог гена у висцералном масном ткиву животиња гајених у леглима просечне величине и третираних ДХТ, као и животиња гајених у малим леглима које нису третиране ДХТ. У висцералном масном ткиву је забележен и ефекат оба испитивана фактора на фосфорилацију, тј. активацију кључног енергетског сензора – АМПК.

Треће потпоглавље, *Субкутано масно ткиво*, организовано је на сличан начин као и претходно. Хистолошком и морфометријском анализом овог депоа белог масног ткива нису детектоване промене величине адипоцита са третманима које би се могле сматрати хипертрофијом или хиперплазијом. Анализа генске експресије показала је да и повећан калоријски унос и хормонски третман доприносе повећању експресије гена укључених у липогене и липолитичке процесе у овом ткиву. За разлику од висцералног масног ткива, експресија АМПК у субкутаном масном ткиву била је значајно смањена под утицајем смањења величине легла.

Четврто потпоглавље, под насловом *Musculus gastrocnemius* обухвата резултате анализа извршених у овом мишићу, као типичном брзо-контрахујућем скелетном мишићу. На основу мерења експресије протеина из сигналног пута инсулина показано је да се њихова експресија углавном мења под утицајем смањене величине легла, док је експресија глукозног транспортера 4 под значајним утицајем ДХТ-третмана. У контексту липидног метаболизма, забележено је значајно повећање експресије гена за карнитин-палмитоил трансферазу 1 и у складу са тиме, за транспотер масних киселина 1 у мишићном ткиву женки пацова гајених у малим леглима и третираних са ДХТ. Код истих животиња забележена је и повећана експресија гена за липолитички ензим – адипоцитну липазу триглицерида. Показан је и значајан ефекат смањене величине легла на експресију маркера биогенезе митохондрија – сиртуин 1 и коактиватор 1 α рецептора активираних пероксизомалним пролифератором. На основу значајног ефекта смањене величине легла на експресију антиоксидативног ензима – дисмутазе 2 супероксида и повећане концентрације малонил-диалдехида у мишићном ткиву женки

пацова гајених у малим леглима и третираних ДХТ, кандидаткиња је претпоставила постојање оксидативног стреса у скелетним мишићима. Уз то, на основу повећане релативне експресије гена за интерлеукин 1 β и интерлеукин 6, претпоставила је да је присутна и инфламација.

Повећана активација кроз фосфорилацију на треонину на позицији 172 значајног енергетског регулатора - ензима АМПК, забележена је у мишићу животиња гајених у малим леглима и третираних ДХТ.

Поглавље ДИСКУСИЈА је организовано у четири целине, у складу са добијеним и описаним резултатима истраживања. Кроз та четири потпоглавља, кандидаткиња показује дубоко разумевање материје којом се у докторској дисертацији бави и на сажет и јасан начин резимира резултате свог истраживања. Критички их поредећи са резултатима других релевантних истраживања, смешта их у актуелни шири контекст и објашњава њихов значај и допринос. Тако, у првом потпоглављу, кандидаткиња дискутује системске параметре инсулинске осетљивости, наглашавајући предиспонирајућу улогу повећаног калоријског уноса у раном периоду живота у развоју инсулинске резистенције. У другом и трећем потпоглављу, дискутоване су промене које су забележене у два анализирана депоа масног ткива, односно у скелетним мишићима. У последњем потпоглављу сумирани су најважнији резултати ове докторске дисертације, а посебно је истакнуто успостављање позитивне повратне спреге између хиперандрогенемije и хиперинсулинемije, као и потенцијал да се АМПК користи као терапеутска мета.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ, кандидаткиња јасно и сажето изводи закључке који произилазе из добијених резултата и директно одговарају на постављене циљеве докторске дисертације. Формулисани су следећи специфични закључци:

- (1) Повећан калоријски унос у раном постнаталном периоду доводи до трајне хиперфагије која се манифестује као повећање телесне масе и удела масног ткива у укупној маси тела код животиња гајених у малим леглима.
- (2) Животиње третиране са ДХТ показују хистолошка и морфолошка обележја карактеристична за дисфункционалне јајнике.
- (3) У висцералном масном ткиву животиња гајених у малим леглима и третираних са ДХТ забележене су промене у величини адипоцита карактеристичне за хипертрофију, док се адипоцити у субкутаном масном ткиву не разликују по величини услед примењених третмана.
- (4) *De novo* липогенеза у висцералном масном ткиву је смањена код женки свих експерименталних група у поређењу са контролним животињама, што може бити механизам спречавања даље експанзије овог депоа масног ткива и чувања његове осетљивости на инсулин.
- (5) Истовремено активирани липогени и липолитички путеви у субкутаном масном ткиву указују на дисфункционалност овог депоа белог масног ткива, узроковану

повећаном масом висцералног масног ткива и системским смањењем осетљивости на инсулин.

- (6) Животиње гајене у малим леглима, а затим третиране са ДХТ имају нарушену инсулинску осетљивост на системском нивоу, као и у скелетним мишићима.
- (7) Унос слободних масних киселина и њихова разградња процесом β -оксидације повећани су у мишићима животиња гајених у малим леглима, а затим третираних са ДХТ.
- (8) Повећана стопа β -оксидације води оксидативном стресу и инфламацији у мишићном ткиву животиња гајених у малим леглима, а затим третираних са ДХТ.
- (9) У висцералном масном ткиву и скелетним мишићима животиња гајених у малим леглима, а затим третираних са ДХТ активирана је АМПК, која својим дејством донекле одржава функционалност и метаболички интегритет ових ткива. Повећан калоријски унос узрокован смањењем величине легла смањује експресију АМПК у субкутаном масном ткиву.

Узимајући у обзир све специфичне закључке, кандидаткиња долази до општег закључка да повећан калоријски унос у раном постнаталном узрасту очигледно доприноси смањењу инсулинске осетљивости у периферним метаболичким ткивима, док је за пуно изражавање инсулинске резистенције кључна интеракција са хиперандрогенемијом.

У последњем поглављу ЛИТЕРАТУРА наведено је 136 релевантних библиографских јединица, које су коришћене за писање ове докторске дисертације. Литература је на адекватан начин цитирана у тексту и наведена.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Mičić B**, Teofilović A, Djordjevic A, Veličković N, Macut D, Vojnović Milutinović D. (2022). AMPK Activation Is Important for the Preservation of Insulin Sensitivity in Visceral, but Not in Subcutaneous Adipose Tissue of Postnatally Overfed Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 11; 23 (16): 8942. (M21, IF₂₀₂₂ 5,6)

DOI: [10.3390/ijms23168942](https://doi.org/10.3390/ijms23168942)

2. **Mičić B**, Djordjevic A, Veličković N, Kovačević S, Martić T, Macut D, Vojnović Milutinović D. (2023). AMPK Activation as a Protective Mechanism to Restrain Oxidative Stress in the Insulin-Resistant State in Skeletal Muscle of Rat Model of PCOS Subjected to Postnatal Overfeeding. *Biomedicines*. 30; 11 (6): 1586. (M22, IF₂₀₂₂ 4,7)

DOI: [10.3390/biomedicines11061586](https://doi.org/10.3390/biomedicines11061586)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Mičić B**, Veličković N, Djordjevic A, Teofilović A, Kovačević S, Radovanović M, Brkljačić J, Macut D, Vojnović Milutinović D. Metabolic disturbances in animal model of Polycystic Ovary: Impact of early postnatal overfeeding. Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS), 6-8 October 2023, Belgrade, Serbia, Book of abstracts p. 144. (M64)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Бојане Б. Мићић (бр. индекса: Б3021/2016) послата је дана 3. новембра 2023. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 7. новембра 2023. године. На основу налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације кандидаткиње Бојане Б. Мићић под називом „Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичих јајника“, утврђен је проценат подударности од 16%. Овај степен подударности претежно је последица подударања назива звања, имена институција и друштава, назива синдрома, органа, гена, протеина, хемијских једињења; симбола којима се означавају гени и протеини; назива коришћених метода, методолошких поступака, имена комерцијално доступних есеја и имена произвођача; симбола којима се приказују статистички резултати и значајности, појединих детаља стандардних експерименталних процедура, као што су састави инкубационих смеша и раствора; делова реченица који сами за себе немају смисао (нпр. „у поређењу са свим осталим експерименталним групама“, „значајан ефекат“, „са контролисаном температуром, „ендогена контрола за нормализацију нивоа иРНК“, „Резултати су приказани као средња вредност“, „животиња по групи“, и сл.); случајне синтагме (нпр. „значајно повећање“, „висцерално масно ткиво“ и сл.).

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње **Бојане Б. Мићић**, под насловом „**Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичих јајника**“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

На основу анализе докторске дисертације кандидаткиње **Бојане Б. Мићић**, под насловом „Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичних јајника“, Комисија закључује да резултати представљају значајан допринос у области разумевања доприноса повећане масе тела пре пубертета развоју метаболичких поремећаја у висцералном и субкутаном масном ткиву, као и скелетним мишићима животиња са синдромом полицистичних јајника. Посебан допринос се огледа у томе што резултати докторске дисертације пружају боље разумевање сложене интеракције између хиперандрогенизма, хиперинсулинемије и гојазности у патофизиологији синдрома полицистичних јајника. У прилог актуелности проблематике и значају добијених резултата, говори и чињеница да су резултати ове докторске дисертације објављени у виду два научна рада у часописима међународног значаја (M21 и M22 категорије), као и да су представљени на једном скупу домаћег значаја.

Комисија је мишљења да докторска дисертација **Бојане Б. Мићић** са добро постављеним циљевима, методолошким поступцима, добијеним резултатима и њиховим тумачењем, пружа значајан оригинални допринос разумевању молекуларних механизма који се налазе у основи патофизиолошких промена карактеристичних за синдром полицистичних јајника.

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 **Бојани Б. Мићић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Допринос повећаног калоријског уноса у раном постнаталном периоду развоју метаболичких поремећаја у анималном моделу синдрома полицистичних јајника“.

У Београду, 13.11.2023. године

КОМИСИЈА:

др Јелена Ђорђевић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Ђуро Мацут, редовни професор,
Универзитет у Београду – Медицински факултет

др Наташа Величковић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ –
Институт од националног значаја за Републику Србију