

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ КАНДИДАТКИЊЕ  
САВЕ РАДОВИЋ

**I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

1. Датум и орган који је именовео комисију:  
21. 02. 2019. године  
Наставно-научно веће Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:
  - (1) **др Татјана Костић**, редовна професорка, Физиологија животиња, 07.07.2008. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председница
  - (2) **др Силвана Андрић**, редовна професорка, Физиологија животиња, 21.07.2009. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, менторка
  - (3) **др Гордана Матић**, редовна професорка, Биохемија и молекуларна биологија, 13.07.2004. године, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, чланица
  - (4) **др Звездана Којић**, редовна професорка, Медицинска физиологија, 04.07.2012. године, Медицински факултет, Универзитет у Београду, чланица
  - (5) **др Соња Каишаревих**, ванредна професорка, Физиологија животиња, 01.01.2017. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, чланица

**II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ**

1. Име, име једног родитеља, презиме:  
**Сава (Миодраг) Радовић**
2. Датум рођења, општина, држава:  
27.05.1987. године, Ивањица, Република Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив:  
Природно-математички факултет  
Дипломске академске студије биологије – Мастер молекуларни биолог
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:  
2013. године, Доктор наука – биолошке науке.
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /

### III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

“Улога инсулинских и IGF1 рецептора у регулацији стероидогенезе и митохондријалне биогенезе у Leydig-овим ћелијама“

### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикана и сл.

Докторска дисертација кандидаткиње Саве Радовић под називом “Улога инсулинских и IGF1 рецептора у регулацији стероидогенезе и митохондријалне биогенезе у Leydig-овим ћелијама“ припада ужој научној области **Физиологија животиња**, подобласт **Ћелијска сигнализација у репродуктивној биологији**. Докторска дисертација је написана на српском језику (латиница), са изводом на српском и енглеском језику, на 171 страни А4 формата и подељена је у 10 поглавља. Дисертација садржи 36 слика, 12 табела и 185 литературних навода.

Докторска дисертација почиње информацијама о месту извођења експерименталног дела рада, пројеката који су обезбедили финансирање дисертације и радовима у којима је приказан или ће бити приказан део резултата истраживања докторске дисертације. Следе 10 главних поглавља:

**(1) Увод** (1 страна) који укратко и једноставно упознаје са проблематиком дисертације.

**(2) Преглед литературе** (30 страна, 5 слика) је подељен на 3 потпоглавља:

**2.1.** Типови, карактеристике и ендокрина функција Leydig-ових ћелија тестиса (16 страна, 3 слике) је потпоглавље у ком су описани типови, карактеристике и развој Leydig-ових ћелија, стероидогенеза као биохемијски процес настанка мушких полних хормона (андрогена), различити нивои регулације стероидогенезе, сигнални путеви и транскрипциони активатори/репресори укључени у регулацију процеса биосинтезе андрогена.

**2.2.** Митохондрије и њихов значај у стероидогенези Leydig-ових ћелија (11 страна, 1 слика) је потпоглавље у ком је описан значај митохондрија у стероидогенези Leydig-ових ћелија, динамика митохондријалне мреже, те карактеристични маркери и регулаторни молекули важни у процесу митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре.

**2.3.** Рецептори за чланове фамилије инсулину сличних фактора раста (4 стране, 1 слика) је потпоглавље у ком су описане карактеристике рецептора за инсулин (INSR) и инсулину сличан фактор раста 1 (*енгл.* insulin like growth factor 1 receptor, IGF1R), као и њихов значај у развоју тестиса у оквиру досадашњих сазнања.

**(3) Циљеви истраживања** (2 стране) су конципирани у 5 концизних делова и у сагласности су са пријавом теме. Сви постављени циљеви се односе на дефинисање улоге INSR и IGF1R у регулацији стероидогенезе и митохондријалне биогенезе/фузије у Leydig-овим ћелијама мишева.

**(4) Материјал и методе** (30 страна, 3 слике, 8 табела) садрже податке о коришћеним хемикалијама, опис експерименталног модела као и детаљан опис 11 метода којима су одређивани биохемијски, физиолошки и молекуларни параметри (ниво хормона у циркулацији и секретован од стране Leydig-ових ћелија, функционалност Leydig-ових ћелија, експресија транскриптата, протеина, ултраструктура Leydig-ових ћелија, број митохондрија итд).

**(5) Резултати** (41 страна, 22 слике, 4 табеле) су подељени на 3 потпоглавља.

**5.1.** Приказани су и описани резултати који потврђују да одсуство INSR и IGF1R значајно утиче на развој нормалног фенотипа мушких репродуктивних органа.

**5.2.** Приказани су и описани резултати који показују да одсуство INSR и IGF1R нарушава стероидогену функцију Leydig-ових ћелија, мења експресију маркера диференцијације, као и маркера развоја мушког и женског пола.

**5.3.** Приказани су и описани резултати који показују да одсуство INSR и IGF1R нарушава транскрипцију молекуларних маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре у стероидогеним ћелијама тестиса, као и да одсуство INSR и IGF1R нема ефекта на ове маркере у стероидогеним ћелијама оваријумима.

**(6) Дискусија** (22 стране, 5 слика) је, у складу са приказаним резултатима, такође подељена на 3 потпоглавља и представља свеобухватну анализу резултата у светлу литературних података. Свако од 3 потпоглавља дискусије је илустровано једном или двама оригиналним сликама.

**(7) Закључци** (4 стране, 1 слика) су, у складу са циљевима и добијеним резултатима, дати у 5 концизних делова и обједињени су у сумарни закључак који је илустрован 1 оригиналном сликом.

**(8) Значај приказаних резултата** (1 страна) садржи најзначајније информације о примени резултата истраживања у развоју клиничких и фармацеутских истраживања.

**(9) Правци будућих истраживања** (1 страна) садрже смернице за даља истраживања.

**(10) Литература** (16 страна) је списак од 185 литературних навода тј. референци.

Поред главних поглавља, дисертација садржи Захвалницу, Биографију кандидата и Кључну документацијску информацију.

## **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**(1) УВОД.** На начин разумљив широј популацији, истакнуто је да су инсулин и IGF1 важни фактори повезани са актуелним здравственим проблемима хумане популације на глобалном нивоу (инсулинска резистенција), као и репродуктивним здрављем. Такође, указани су и недовољно истражени механизми деловања ових фактора на молекуларном нивоу.

Чланице Комисије сматрају да је поглавље Увод написано јасно, сажето и стилем разумљивим широј популацији, а не само научној заједници. Ово поглавље даје увид у познате чињенице, наводи оно што није познато, и у складу са тим говори ка чему су усмерена истраживања у докторској дисертацији.

**(2) ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.** Ово поглавље је подељено на 3 потпоглавља:

**2.1. Типови, карактеристике и ендокрина функција Leydig-ових ћелија тестиса.** У овом потпоглављу описана је комплексност структурне и функционалне организације тестиса. Описани су типови Leydig-ових ћелија карактеристични за различите стадијуме развоја тестиса, као и главне морфолошке, цитолошке и функционалне одлике сваког од наведених типова ћелија. Дат је преглед литературних података о најважнијим регулаторима диференцијације феталних и адултних Leydig-ових ћелија. Описан је процес биосинтезе мушких полних хормона, тј. стероидогенеза, извори холестерола и најважнији елементи машинерије која спроводи процес стероидогенезе. Наведен је преглед досадашњих сазнања о различитим нивоима регулације стероидогенезе (нервна, ендокрина, паракрина (криптокринина и јукстакрина), аутокринина, епигенетска) са посебним освртом на сигналне путеве и транскрипционе активаторе и репресоре који су укључени у регулацију стероидогенезе.

**2.2. Митохондрије и њихов значај у стероидогенези Leydig-ових ћелија.** У овом подпоглављу дат је преглед литературних података о улози митохондрија у стероидогенези Leydig-ових ћелија. Наведени су параметри функционалности митохондрија који су до сада идентификовани као значајни фактори у регулацији стероидогенезе. Посебано је наглашен значај контроле квалитета митохондрија и митохондријалне динамике у одржавању здраве и функционалне популације митохондрија у ћелији. Дефинисани су процеси који чине митохондријалну динамику и дат је преглед основних молекуларних маркера ових процеса. Представљен је детаљан преглед сазнања о карактеристикама и функцији молекуларних маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре, као и до сада познатим факторима, сигналним путевима и епигенетским механизмима укљученим у регулацију ових процеса.

**2.3. Рецептори за чланове фамилије инсулину сличних фактора раста.** У овом подпоглављу дат је преглед сазнања о биолошким ефектима инсулина и инсулину сличних фактора раста. Такође, наведена су сазнања о структури INSR и IGF1R, њиховом афинитету за чланове фамилије инсулину сличних фактора раста, као и сигналним путевима који се покрећу у одговору на њихову активацију. Посебна пажња је посвећена прегледу досадашњих сазнања о улози INSR и IGF1R у развоју и функцији тестиса.

Сумирано, у поглављу преглед литературе описано је оно што је познато, дискутабилно, а указано је на оно што је непознато у досадашњим истраживањима, а што потврђује потребу за истраживањима везаним за докторску дисертацију и основа је дефинисаног циља дисертације.

Чланице Комисије сматрају да је поглавље Преглед литературе написано јасно и систематично. Доступним литературним подацима је потврђено интересовање научне заједнице и потреба за разјашњавањем прецизних молекуларних догађаја везаних за регулацију функције Leydig-ових ћелија и митохондријалне динамике посредством INSR и IGF1R сигнализације. Такође, наведено је да су многи аспекти ове регулације и даље непознати што указује на оправданост и значај даљих истраживања у овој области.

**(3) ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** су конципиран дефинисањем општег циља истраживања, а потом и специфичних циљева. Општи циљ истраживања је окарактерисати *in vivo* улогу INSR и IGF1R у регулацији стероидогене функције и митохондријалне биогенезе/фузије у Leydig-овим ћелијама. У складу са општим циљем, постављени су специфични циљеви истраживања:

**(1)** Окарактерисати улогу INSR и IGF1R у регулацији стероидогене функције Leydig-ових ћелија мишева старих 21 дан (*енгл. postnatal day 21<sup>st</sup>, P21*) и 80 дана (*енгл. postnatal day 80<sup>th</sup>, P80*).

**(2)** Окарактерисати улогу INSR и IGF1R у диференцијацији судбине Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева.

**(3)** Окарактерисати улогу INSR и IGF1R у експресији молекуларних маркера диференцијације пола у Leydig-овим ћелијама P21 и P80 мишева.

**(4)** Окарактерисати улогу INSR и IGF1R у регулацији митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре у Leydig-овим ћелијама P21 мишева, као и дефинисати потенцијалне разлике између полова.

**(5)** Окарактерисати улогу INSR и IGF1R у регулацији експресије главних компоненти сигналног пута од INSR и IGF1R у Leydig-овим ћелијама P21 мишева.

Чланице Комисије сматрају да су циљеви ове дисертације јасно дефинисани, правилно конципирани и да су у складу са пријавом теме и садржајем дисертације.

**(4) МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** дају детаљан опис метода коришћених за реализовање постављених циљева. Такође, текст поглавља садржи информације о хемикалијама коришћеним у раду, врсти експерименталних животиња (опис експерименталног модела са шемама), условима гајења, идентификацији животиња у гајилишту и одређивању њиховог генотипа. Истакнуто је да су сви експерименти одобрени од стране локалног Етичког комитета Универзитета у Новом Саду и наведен је број одлуке која садржи дозволу. Експериментални поступак за сваку фазу истраживања је сумиран. Детаљно је описан модел кондиционе делеције INSR и IGF1R специфично у стероидогеним ћелијама, а као моћан и тзв. “*state-of-the art*“ модел функционалне геномике. За *in vivo* експерименте су коришћени мишеви следећих генотипова:

- (1) Контролна група – мишеви који су имали нормално функционалне INSR и IGF1R (*Cyp11a1Cre<sup>-/-</sup> Insr<sup>wt/fx</sup> Igf1r<sup>fx/fx</sup>*, *Cyp11a1 Cre<sup>-/-</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igf1r<sup>wt/fx</sup>* и *Cyp11a1Cre<sup>-/-</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igf1r<sup>fx/fx</sup>*).
- (2) SKO-*Insr* група – “*single knockout*“ мишеви са делецијом *Insr* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igf1r<sup>wt/fx</sup>*).
- (3) SKO-*Igf1r* група – “*single knockout*“ мишеви са делецијом *Igf1r* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>wt/fx</sup> Igf1r<sup>fx/fx</sup>*).
- (4) ДКО група – “*double knockout*“ мишеви са делецијом *Insr* и *Igf1r* (*Cyp11a1Cre<sup>+</sup> Insr<sup>fx/fx</sup> Igf1r<sup>fx/fx</sup>*).

Описане су методе коришћене за одређивања биохемијских, молекуларно-биолошких и физиолошких параметара (ниво хормона у циркулацији и ћелијском медијуму, концентрација секундарног гласника у ћелијама, релативна експресија гена и протеина, итд). Примењене методе су поуздане и адекватне за остваривање описаних експерименталних поставки и циљева истраживања. Све методе су верификоване од стране међународне научне јавности у радовима.

Квантитативно изражено, праћено је 14 функционалних параметара:

- (1) Концентрација андрогена у серуму.
- (2) Концентрација естрадиола у серуму.
- (3) Концентрација андрогена екстрахованих из комадића тестиса.
- (4) Концентрација андрогена продукованих од стране Leydig-ових ћелија.
- (5) Концентрација прогестерона продукованог од стране Leydig-ових ћелија.
- (6) Концентрација естрадиола продукованог од стране Leydig-ових ћелија.
- (7) Концентрација цикличног аденозин монофосфата (*енгл.* cyclic adenosine monophosphate, cAMP) и садржају Leydig-ових ћелија.
- (8) Експресија хидроксистероид дехидрогеназе 3 бета (HSD3B) у Leydig-овим ћелијама.
- (9) Активност ензима HSD3B.
- (10) Потенцијал мембране митохондрија.
- (11) Број, дијаметар и волумен митохондрија.
- (12) Митохондријална маса.
- (13) Релативна квантификација експресије транскрипата (50 различитих гена).
- (14) Релативна квантификација експресије протеина (19 различитих протеина).

Чланице Комисије сматрају да су коришћени материјал и методе адекватни. Методе за реализацију наведених циљева истраживања су савремене, довољно детаљно описане, прецизне и адекватне за добијање валидних резултата. Изабране методе статистичке обраде података су одговарајуће и примерене типу анализираних података/резултата.

**(5) РЕЗУЛТАТИ** су приказани у форми слика или табела које су детаљно описане. Свака слика/табела садржи детаљну легенду која укључује и опис методологије настанка резултата. Нивои статистичке значајности разлика су јасно дефинисани и видљиви. Резултати приказују 14 различитих параметара функционалности на различитим нивоима организације: нивое хормона (андрогени, естрадиол) у циркулацији; нивое андрогена у ткиву тестиса; продукцију хормона

(андрогени, прогестерон, естрадиол) у медијуму Leydig-ових ћелија; продукцију секундарног гласника (сАМР) у ћелијском садржају Leydig-ових ћелија; експресију транскрипата за 50 различитих гена у Leydig-овим ћелијама свих група, а у сличном маниру и 18 различитих гена у ткиву оваријума, 16 различитих гена у ткиву надбубрежне жлезде, 11 различитих гена у ткиву семиниферних тубула и 11 различитих гена у ткиву тестиса; експресију 19 различитих протеина у Leydig-овим ћелијама; ултраструктуру Leydig-ових ћелија; број, дијаметар, волумен и масу митохондрија у Leydig-овим ћелијама. Поглавље резултати је подељено на 3 потпоглавља.

**5.1. Фенотипске карактеристике мушког репродуктивног система препуберталних (P21) и адултних (P80) мишева са кондиционалном делецијом *Insr* и *Igflr* гена у стероидогеним ткивима.** У овом потпоглављу су приказани и описани резултати који потврђују да недостатак INSR и IGF1R код P21 и P80 мужјака мишева значајно нарушава развој нормалног фенотипа мушких репродуктивних органа (смањује аногениталну дистанцу, величину и масу тестиса, величину семених везикула и епидидимиса). Праћење фенотипских карактеристика није био један од циљева ове дисертације, али су ови налази једна од значајних и релевантних потврда присуства делеције *Insr* и *Igflr* гена тј. функционалности примењеног модела.

**5.2. Ефекат кондиционалне делеције *Insr* и *Igflr* гена у стероидогеним ткивима на диференцијацију и функционалне карактеристике Leydig-ових ћелија препуберталних (P21) и адултних (P80) мишева.** У овом потпоглављу су приказани и описани резултати који потврђују да одсуство INSR и IGF1R нарушава стероидогену функцију Leydig-ових ћелија, и мења профил транскрипције молекуларних маркера диференцијације, као и молекуларних маркера развоја мушког и женског пола у Leydig-овим ћелијама. Ниво андогена у серуму, стероидогени капацитет и стероидогена активност Leydig-ових ћелија, експресија транскрипата за главне компоненте стероидогене машинерије су смањени у Leydig-овим ћелијама P21 и P80 мишева са делецијом *Insr* и *Igflr* гена. У истим ћелијама, експресија транскрипата за главне репресоре стероидогенезе је повећана, а транскрипција маркера пролиферације и диференцијације је измењена. Посебно интересантан и интригантан налаз је повећање транскрипције молекуларних маркера женског пола, као и активности ензима ароматазе (који конвертује тестостерон у естрадиол), што указује на тзв. “феминизацију“ Leydig-ових ћелија тј. стицање карактеристика стероидогених ћелија које секретују женске полне хормоне.

**5.3. Ефекат кондиционалне делеције *Insr* и *Igflr* гена у стероидогеним ткивима на главне молекуларне маркере митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре у Leydig-овим ћелијама препуберталних (P21) мишева** У овом потпоглављу су приказани и описани резултати који потврђују да одсуство INSR и IGF1R значајно нарушава транскрипцију молекуларних маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре у стероидогеним ћелијама тестиса, али не и у оваријумима, P21 мишева. Ниво PGC1 протеина, главног регулатора митохондријалне биогенезе је смањен. Транскрипција гена за главне маркере митохондријалне биогенезе је смањена, а транскрипција гена за маркере фузије/архитектуре је повећана у Leydig-овим ћелијама, док у оваријумима није уочена промена експресије ових маркера. У надбубрежним жлездама је уочено повећање транскрипције маркера фузије/архитектуре код оба пола. Ткиво оваријума и надбубрега је коришћено као тзв. контролно стероидогено ткиво. Поред наведених, резултати у овом потпоглављу показују да је број митохондрија у Leydig-овим ћелијама смањен, а њихов дијаметар и волумен повећани услед одсуства INSR и IGF1R.

Чланице Комисије сматрају да је кандидаткиња адекватно и систематично представила резултате, да су они јасно протумачени, те да су оправдали остваривање постављених циљева истраживања.

**(6) ДИСКУСИЈА** је подељена на 3 потпоглавља, а у складу са организацијом приказаних резултата. Детаљно је приказан значај добијених резултата у оквиру генералног и специфичних контекста истраживачке области у оквиру које је рађена докторска дисертација. Упоређени су резултати са резултатима познатим широј научној јавности и указано је да се бројна нова сазнања добијена током истраживања везаних за докторску дисертацију кандидаткиње Саве Радовић уклапају и доприносе напретку у области. Јасним чињеницама је предочено да су рецептори за инсулин и IGF1 значајно укључени у регулацију: развоја фенотипа мушких репродуктивних органа; диференцијације и стероидогене функције Leydig-ових ћелија; транскрипције маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре у Leydig-овим ћелијама; као и морфологије Leydig-ових ћелија. Поред наведеног, указано је на потенцијалне механизме разјашњавања улоге INSR и IGF1R у регулацији стероидогене функције Leydig-ових ћелија на различитим стадијумима развоја (препубертални-P21 и адултни-P80); механизме који доводе до појаве тзв. “феминизације“ Leydig-ових ћелија (стицање својстава стероидогених ћелија које секретују женске полне хормоне), као и на механизме који мењају експресију маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре у Leydig-овим ћелијама услед недостатка ових рецептора.

Чланице Комисије сматрају да је кандидаткиња представила критичку анализу и интерпретацију добијених резултата. Резултати истраживања стављени су у контекст досадашњих релевантних литературних података из ове области. Литературни подаци са којима су поређени резултати дисертације су актуелни, објављени у часописима високог ранга везаним за област. Дискусија је научно утемељена, свеобухватна и детаљна, што указује на одлично познавање проблематике.

**(7) ЗАКЉУЧЦИ** су изведени у складу са постављеним циљевима и добијеним резултатима.

(1) Одсуство INSR и IGF1R значајно смањује стероидогену функцију Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева.

(2) Одсуство INSR и IGF1R значајно нарушава диференцијацију Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева.

(3) Одсуство INSR и IGF1R значајно нарушава експресију молекуларних маркера развоја мушког пола и доводи до тзв. “феминизације“ (стицања карактеристика стероидогених ћелија које секретују женске полне хормоне) Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева.

(4) Одсуство INSR и IGF1R значајно нарушава експресију маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре, као и митохондријалну фазу стероидогенезе у Leydig-овим ћелијама, али нема ефекта на исте маркере у оваријумима P21 мишева.

(5) Одсуство INSR и IGF1R значајно нарушава експресију главних компоненти сигналног пута од INSR/IGF1R, а које су истовремено укључене и у регулацију стероидогенезе и митохондријалне биогенезе/фузије у Leydig-овим ћелијама P21 мишева.

Чланице Комисије сматрају да су закључци докторске дисертације у складу са постављеним циљевима и добијеним резултатима, те да су формулисани јасано, систематично и концизно.

**(8) ЗНАЧАЈ ПРИКАЗАНИХ РЕЗУЛТАТА** укратко описује и објашњава допринос резултата приказаних у дисертацији бољем разумевању улоге INSR и IGF1R у регулацији развоја и функције Leydig-ових ћелија мишева различитих узрасних категорија. Такође, део резултата представља отварање новог поља истраживања митохондријалне динамике у стероидогеним ћелијама у условима смањене инсулинске/IGF1 сигнализације (као модел тзв. ћелијске инсулинске резистенције аналоган инсулинској резистенцији и метаболичком синдрому у хуманој популацији) о коме, према подацима доступним у литератури, нема сазнања.

Чланице Комисије сматрају да је значај приказаних резултата написан на јасан и концизан начин и да указује на могућу примену резултата, као полазне тачке за даље клиничке и фармацеутске студије везане за потенцијалну терапију репродуктивних обољења, кардиоваскуларних болести, гојазности, метаболичког синдрома, инсулинске резистенције итд. Посебно са аспекта да је модел кондиционе делеције INSR и IGF1R у стероидогеним ткивима, према подацима доступним у литератури, први модел тзв. ћелијске инсулинске резистенције у стероидогеним ћелијама и може имати широку примену, како у базичним, тако и у клиничким и фармацеутским истраживањима и студијама.

**(9) ПРАВЦИ БУДУЋИХ ИСТРАЖИВАЊА** описују смернице за даља истраживања, која би представљала надоградњу објављених резултата у области којом се бави дисертација.

(1) Дефинисати потенцијалне промене на нивоу ултраструктуре Leydig-ових ћелија P80 мишева којима недостају INSR и IGF1R, односно, одговорити на питање да ли и у којој мери долази до обнове популације у адултном периоду и какве се морфолошке и цитолошке промене дешавају.

(2) Дефинисати потенцијалне промене у митохондријалној морфологији/архитектури, као и експресији маркера митохондријалне биогенезе/фузије, у Leydig-овим ћелијама P80 мишева којима недостају INSR и IGF1R.

(3) Дефинисати ефекте тзв. “појачане“ сигнализације од INSR и/или IGF1R (евентуални синергистички ефекат, као и ефекат активације сваког рецептора појединачно) едитовањем *Insr* и *Igf1r* гена у примарној култури Leydig-ових ћелија помоћу CRISPR/Cas система.

(4) У циљу дефинисања општег механизма регулације митохондријалне биогенезе/фузије, пратити ефекат *in vitro* инактивације INSR и IGF1R, као и ефекат стероидних хормона (Т и Е2), коришћењем других стероидогених (ћелије које секретују стероидне хормоне) и тзв. нестероидогених типова ћелија.

(5) Коришћењем података добијених из *in vivo* и *in vitro* експерименталних модела формирати математичке моделе коришћењем теорије графа и/или других математичких модела.

Чланице Комисије сматрају да су правци будућих истраживања написани на јасан и концизан начин, те да представљају врло логичан наставак истраживања представљених у дисертацији.

**ЛИТЕРАТУРА** представља списак од укупно 185 литературних навода. Значајан број радова су тзв. “пионирски радови“, а највећи број литературних навода подразумева радове објављене у току последњих година у релевантним научним часописима, као и одређен број ревија.

Чланице Комисије сматрају да су литературни наводи адекватно одабрани, актуелни и у складу са проблематиком дисертације. На основу одабраних референци Комисија закључује да кандидат одлично познаје област и предмет истраживања дисертације.

**Сумирано, чланице Комисије позитивно оцењују све делове докторске дисертације.**

#### **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

**M21 (рад у врхунском међународном часопису)**

(1) Radovic SM, Starovlah IM, Capo I, Miljkovic D, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2019). Insulin/IGF1 signalling regulates the mitochondrial biogenesis markers in steroidogenic cells of prepubertal testis, but not ovary. *Biol Reprod* 100(1):253-267. (IF=3.184)



**M32 (predavaње po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu)**

(1) Andric SA, Radovic SM, Starovlah IM, Nef S, Kostic TS (2018). Mitochondria in response to stress and insulin resistance. *MouseAge meeting: Geroprotectors: Achievements and Challenges*, Rome, Italy, 24-25.09.2018.

(2) Andric SA, Radovic SM, Starovlah IM, Nef S, Kostic TS (2018). Mitochondria in response to stress and insulin resistance. *4<sup>th</sup> congress of physiological sciences of Serbia with international participation. Current trends in physiological sciences: from cell signals to the biology of aging*, Nis, Serbia, 19-23.09.2018.

**M34 (Саопштења са међународног скупа штампано у изводу)**

(1) Radovic SM, Starovlah IM, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2018). Deletion of insulin and IGF1 receptors genes disturbs expression of the key mitochondrial biogenesis regulators in mouse prepubertal steroidogenic cells of testes but not ovaries. *The 18th FEBS YSF*, Prague, Czech Republic, 04-07.07.2018.

(2) Radovic SM, Starovlah IM, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2018). Deletion of insulin and IGF1 receptors genes disturbs expression of the key mitochondrial biogenesis regulators in mouse prepubertal steroidogenic cells of testes but not ovaries. *The 43rd FEBS Congress*, Prague, Czech Republic, 07-12.07.2018.

**M62 (Predavaње po pozivu sa nacionalnog skupa štampano u izvodu)**

(1) Andric SA, Radovic SM, Starovlah IM, Nef S, Kostic TS (2018). Mitohondrije u odgovoru na stres i insulinsku rezistenciju. *Drugi kongres biologa Srbije: Osnovna i primenjena istraživanja metodika nastave*. Kladovo, Srbija, 25-30.09.2018.

**M64 (Саопштења са националног скупа штампано у изводу)**

(3) Radovic SM, Starovlah IM, Nef S, Kostic TS, Andric SA (2018). Delecija gena za insulinski i IGF1 receptor uzrokuje promenu ekspresije ključnih regulatora mitohondrijalne biogeneze u steroidogenim ćelijama testisa, ali ne i ovarijuma, prepubertalnih miševa. *Drugi kongres biologa Srbije: Osnovna i primenjena istraživanja metodika nastave*, Kladovo, Serbia, 25-30.09.2018.

(4) Radović SM, Starovlah IM, Nef S, Kostić TS, Andrić SA (2017). The expression of key regulators of mitochondrial biogenesis is disturbed in steroidogenic cells of prepubertal testes, but not ovaries in mice with deletion of genes for insulin and IGF1 receptors in steroidogenic tissues. *1<sup>st</sup> Congress of Molecular Biologists of Serbia, CoMBoS*, Belgrade, Serbia, 20-22.09.2017.

(5) Radović SM, Marković A, Milošević M, Starovlah IM, Čapo I, Nef S, Kostić TS, Andrić SA (2017). The absence of insulin and igf1 receptors in steroidogenic cells disturbs transcription of main markers of sexual determination and development as well as mitochondrial biogenesis in seminiferous tubules of prepubertal mice. *1<sup>st</sup> Congress of Molecular Biologists of Serbia, CoMBoS*, Belgrade, Serbia, 20-22.09.2017.

(6) Radović SM, Starovlah IM, Nef S, Kostić TS, Andrić SA (2017). Insulin and IGF1R receptors drive expression of the key regulators of mitochondrial biogenesis in steroidogenic cells of prepubertal testis, but not ovaries. *Joint Meeting of National Physiological Societies "New Perspectives in Physiological Research – Young Investigator Forum"*, Subotica, Serbia, 25-27.05.2017.

Чланице Комисије констатују да је кандидаткиња Сава Радовић на основу резултата добијених експерименталним истраживачким радом на докторској дисертацији објавила један научни рад у часопису категорије M21, као први аутор, те је тим испунила прописане услове за одбрану докторске дисертације. Поред тога, први аутор је два саопштења на међународним скуповима и четири саопштења на националним скуповима, а коаутор два предавања по позиву на међународним скуповима и једног предавања по позиву на националном скупу.

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу резултата истраживања приказаних у докторској дисертацији изведени су закључци.

(1) Одсуство INSR и IGF1R смањује стероидогену функцију Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева. Закључак је изведен на основу:

- Значајно смањене концентрације андрогена у серуму.
- Значајно смањене базалне продукције андрогена, стероидогеног капацитета и стероидогене активности Leydig-ових ћелија.
- Значајно смањене концентрације cAMP, једног од главних сигналних молекула у регулацији стероидогенезе Leydig-ових ћелија.
- Значајно смањене релативне експресије транскрипата за стероидогене ензиме и *Ins13* (један од главних маркера функционалности) Leydig-ових ћелија.
- Значајно смањене релативне експресије транскрипата за један од главних транскрипционих активатора стероидогенезе и развоја пола, *Sfl*, у Leydig-овим ћелијама.
- Значајно повећане релативне експресије транскрипата за главне транскрипционе репресоре стероидогенезе и развоја пола, *Dax1* и *Arr19*, у Leydig-овим ћелијама.

(2) Одсуство INSR и IGF1R нарушава диференцијацију Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева. Закључак је изведен на основу:

- Значајно смањеног броја Leydig-ових ћелија.
- Значајне промене релативне експресије транскрипата за неке од маркера пролиферације и диференцијације ћелија (*Pdgfra*, *Tsp2*, *Pcna*, *Lef1*) у Leydig-овим ћелијама.
- Нарушене морфологије и ултраструктуре Leydig-ових ћелија P21 мишева.

(3) Одсуство INSR и IGF1R нарушава експресију молекуларних маркера развоја мушког пола и доводи до појаве карактеристика женског пола тј. тзв. “феминизације“ Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева. Закључак је изведен на основу:

- Значајно повећане релативне експресије транскрипата за главне молекуларне маркере развоја женског пола (*Wnt4*, *Rspo1*) у тестисима.
- Значајно повећане релативне експресије транскрипата за ароматазу, *Cyp19a1*, (специфично у Leydig-овим ћелијама, али не и у остатку тестиса) и значајно повећане продукције E2 у Leydig-овим ћелијама.
- Значајно повећане релативне експресије *Sry* транскрипата у Leydig-овим ћелијама P21 мишева.
- Значајно смањене релативне експресије *Sry* транскрипата у Leydig-овим ћелијама P80 мишева.
- Значајно повећане релативне експресије *Amh* и *Sox9* транскрипата у Leydig-овим ћелијама.

(4) Одсуство INSR и IGF1R нарушава експресију маркера митохондријалне биогенезе и фузије/архитектуре, као и митохондријалну фазу стероидогенезе у Leydig-овим ћелијама, али нема ефекта на исте маркере у оваријумима P21 мишева. Закључак је изведен на основу:

- Значајно смањене релативне експресије главних маркера митохондријалне биогенезе (*Pparg1a*, *Tfam*, *Mtnd1*) у Leydig-овим ћелијама, и непромењене релативне експресије у оваријумима.

- Значајно повећане релативне експресије главних маркера митохондријалне фузије (*Mfn1*, *Mfn2*) у Leydig-овим ћелијама, и непромењене релативне експресије у оваријумима.
- Значајно смањеног броја и значајно повећаног дијаметра и волумена митохондрија у Leydig-овим ћелијама.
- Нарушене митохондријалне фазе стероидогенезе (продукција прогестерона и експресија *Cyp11a1* и *Hsd3b6*) у Leydig-овим ћелијама.

(5) Одсуство INSR и IGF1R нарушава експресију главних компоненти сигналног пута од INSR/IGF1R истовремено укљученог у регулацију стероидогенезе и митохондријалне биогенезе/фузије у Leydig-овим ћелијама P21 мишева. Закључак је изведен на основу:

- Значајно промењене експресије Akt, MEK1/2, ERK1/2, p38MAPK и SAPK/JNK киназа у Leydig-овим ћелијама.

Сумирано, закључено је да одсуство INSR и IGF1R у стероидогеним ћелијама препуберталних (P21) и (P80) адултних мишева: (1) нарушава диференцијацију Leydig-ових ћелија; (2) нарушава стероидогену функцију и развој андрогених карактеристика Leydig-ових ћелија и (3) узрокује тзв. “феминизацију“ Leydig-ових ћелија. Поред тога, одсуство INSR и IGF1R у стероидогеним ћелијама препуберталних (P21) мишева: (1) смањује број митохондрија и повећава њихов дијаметар у Leydig-овим ћелијама; (2) смањује експресију маркера митохондријалне биогенезе у Leydig-овим ћелијама тестиса, али не и стероидогеним ћелијама оваријума; (3) повећава експресију маркера митохондријалне фузије/архитектуре у Leydig-овим ћелијама тестиса, али не и у стероидогеним ћелијама оваријума; (4) смањује експресију киназа које су укључене у трансдукцију сигнала од INSR/IGF1R, а такође су и познати регулатори митохондријалне биогенезе и стероидогенезе; (5) драматично смањује митохондријалну фазу стероидогенезе и експресију стероидогених ензима у Leydig-овим ћелијама, пре свега оних који су локализовани у митохондријама.

Чланице Комисије сматрају да су закључци односно резултати истраживања докторске дисертације кандидаткиње Саве Радовић у складу са постављеним циљевима, те да су формулисани свеобухватно, систематично, јасано и концизно.

#### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидаткиња је адекватно анализираола, систематизовала у логичне целине, приказала и успешно протумачила резултате истраживања. Свеобухватном и детаљном дискусијом, резултати су објективно и критички упоређени са резултатима других аутора. Изведени закључци дају директне одговоре на постављене циљеве докторске дисертације.

Чланице Комисије оцењују позитивном оценом начин приказа и тумачења резултата истраживања докторске дисертације кандидаткиње Саве Радовић.

## IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме:

Чланице Комисије оцењују да је докторска дисертација кандидаткиње Саве Радовић у потпуности урађена и написана у складу са образложењем и планом наведеним у пријави теме докторске дисертације.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе:

Докторска дисертација кандидаткиње Саве Радовић садржи све битне елементе: адекватан увод; преглед досадашњих литературних података са јасном назнаком познатих, дискутабилних и непознатих сазнања; јасно дефинисан проблем и циљ истраживања; јасан приказ методологије рада; јасан и систематичан приказ резултата; свеобухватну и јасну дискусију научне заснованости резултата; јасно и правилно изведене закључке у складу са постављеним циљем истраживања. У списку литературе налазе се све литературне јединице које су цитиране у тексту дисертације. Поред обавезних, описани су значај резултата и праваци будућих истраживања.

На основу свега наведеног, чланице Комисије закључују да докторска дисертација кандидаткиње Саве Радовић садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци:

Докторска дисертација кандидаткиње Саве Радовић је оригиналан допринос науци јер приказује бројне оригиналне научне резултате из области молекуларне физиологије и ћелијске сигнализације Leydig-ових ћелија, као представника ћелија које продукују стероидне хормоне. Резултати дисертације доприносе разјашњавању улоге INSR и IGF1R у регулацији диференцијације судбине, митохондријалне динамике и функционалне компетентности Leydig-ових ћелија за биосинтезу андрогених хормона. Први пут је показан значај сигнализације од INS и IGF1 рецептора за развој андрогених карактеристика Leydig-ових ћелија, те да одсуство INSR и IGF1R значајно нарушава експресију молекуларних маркера развоја мушког пола и доводи до тзв. “феминизације” (стицање карактеристика стероидогених ћелија женског пола) Leydig-ових ћелија P21 и P80 мишева. Део резултата публикован је у научном раду ранга M21.

На основу свега изнетог, чланице Комисије сматрају да докторска дисертација поседује све елементе оригиналног научног дела, а добијени резултати представљају оригиналан научни допринос, те стога докторска дисертација кандидаткиње Саве Радовић представља оригиналан допринос науци.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања:

Чланице Комисије сматрају да дисертација не садржи формалне нити суштинске недостатке.

**Напомена:** Докторска дисертација је прошла проверу оригиналности применом софтвера за детекцију плагијаризма “iThenticate”, који је показао да тзв. “similarity index” износи 4 % (према упутству произвођача све вредности испод 15% представљају оригиналан рад).

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Чланице Комисије предлажу да се докторска дисертација **Саве М Радовић**, под насловом **“Улога инсулинских и IGF1 рецептора у регулацији стероидогенезе и митохондријалне биогенезе у Leydig-овим ћелијама“**, прихвати и да се кандидаткињи одобри јавна одбрана.

*У Новом Саду*

*01.03.2019. године*

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

---

др Татјана Костић, редовни професорка  
Природно-математички факултет  
Универзитет у Новом Саду  
председница комисије

---

др Силвана Андрић, редовна професорка  
Природно-математички факултет  
Универзитет у Новом Саду  
менторка

---

др Гордана Матић, редовна професорка  
Биолошки факултет  
Универзитет у Београду  
чланица комисије

---

др Звездана Којић, редовна професорка  
Медицински факултет  
Универзитет у Београду  
чланица комисије

---

др Соња Каишаревић, ванредна професорка  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду  
чланица комисије