

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.07.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Кораћ, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Снежане Видаковић, редовног професора Медицинског факултета Универзитета у Београду, о урађеној докторској дисертацији **Исидоре С. Протић**, која је запослена као биолог мастер – здравствени сарадник на одељењу Медицински потпомогнуте оплодње Гинеколошко акушерске Клинике Универзитетског клиничког центра Србије у Београду, под насловом „**Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Бато Кораћ, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Лидија Тулић, доцент, Универзитет у Београду-Медицински факултет и др Игор Голић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Биолошки факултет. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Исидоре С. Протић**, под насловом „**Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида**“, урађена је у сарадњи одељења Медицински потпомогнуте оплодње Гинеколошко акушерске Клинике Универзитетског клиничког центра Србије у Београду и Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Докторска дисертација има 32 стране и подељена је у седам поглавља: Увод (8 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методи (3 стране), Резултати (9 страна), Дискусија (4 стране), Закључци (1 страна) и Литература (6 страна). Дисертација садржи 2 табеле и 20 слика.

У дисертацији је цитирано 86 библиографских јединица уз 2 интернет странице. Докторска дисертација садржи и 8 уводних страна и то: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику и садржај. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (4 стране).

Анализа докторске дисертације:

У овој докторској дисертацији испитивани су тубулински код (експресија α -тубулина/ацетилованог α -тубулина) и цинк код (експресија транспортера цинка, ZIP6, ZIP10 и ZIP14), као маркери хетерогености хуманих сперматозоида код нормо- и астенозооспермије. Наиме, сперматозиди се међусобно разликују по фертилизационој способности кроз структурну зрелост и покретљивост али и способност капацитације, акрозомалне реакције и самог процеса оплодње. Све те карактеристике зависе не само од елемената на ћелијском, већ и на молекуларном нивоу. Иако сперматозиди могу бити класификовани као нормални у

смислу морфологије, покретљивости и концентрације, могу се веома разликовати на субћелијском и/или молекулском. Та хетерогеност се директно одражава на њихову главну улогу, постизање успешне оплодње.

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња је у оквиру седам целина дала детаљан приказ веома скромног броја података из литературе који се односе на проблематику докторске дисертације, у складу са циљем и постављеним задацима. На почетку овог поглавља, кандидаткиња је детаљно описала проблематику карактеризације и дефинисања хетерогености ћелија као биолошког појма. Затим је описана грађа мушког репродуктивног система да се нагласи просторна и временска раздвојеност формирања и сазревања сперматозоида. Процес сперматогенезе, спермиогенезе и спермијација су детаљно приказани, као и грађа сперматозоида и аксонеме. Посебно је дат преглед посттранслационих модификација α -тубулина, тубулински код и улога цинка и његових транспортера у овим процесима. У последњој целини описан је метод интраутерине инсеминације (ИУИ) као поступак у биомедицински потпомогнутој оплодњи.

С обзиром на разноврсност проблема у утврђивању узрока мушке неплодности на нивоу сперматозоида, сагледавање њихове хетерогености у циљу упознавања молекулских маркера и разлика међу њима, кандидаткиња је поставила као **ЦИЉЕВЕ ИСТРАЖИВАЊА** за тубулински код: утврђивање ћелијске и молекулске основе њихове хетерогености; праћење структурне хетерогености на нивоу ацетилације као посттранслационе модификације (ПТМ) α -тубулина, а за цинк код: праћење функцијске хетерогености на нивоу експресије транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14; испитивање њиховог присуства, имунолокализације и дистрибуције у субдоменима сперматозоида у нормо- и астенозооспермичним сперматозоидима, као и утврђивање и поређење ефеката обраде сперме за ИУИ у односу на нативан узорак.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ** дати су подаци о коришћеном биолошком материјалу, начин припреме кроз модификован протокол ради добијања чисте ћелијске фракције и представљен експериментални дизајн по први пут примењен у истраживању појединачних ћелија. Описани су примењени методи за имунолокализацију испитиваних протеина цитохемијским, флуоресцентним и голд обележавањем. Поред тога, детаљно су описани методи квантификације у компартментима сперматозоида и субкомпартментима главног региона, као и статистички методи коришћени за анализу и поређење добијених резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовано је у неколико целина, а у складу са постављеним циљевима. Кандидаткиња добијене експерименталне податке приказује јасно графички и илустративно, уз примену одговарајуће статистичке обраде када је то потребно.

У првом поглављу су представљени резултати рутинског бојења сперматозоида у зависности од грађе и биомолекула присутних у компартментима сперматозоида, глави, средишњем делу и репу да би се утврдила хетерогеност у њиховој морфологији. У наставку су представљени резултати који се односе на имуноцитохемијско, имунофлуоресцентно и имуноголד утврђивање експресије и локализације α -тубулина и ацетилованог α -тубулина путем светлосне, конфокалне ласер скенирајуће и трансмисионе електронске микроскопије. Функцијска хетерогеност је представљена кроз имунофлуоресцентно утврђивање експресије и локализације транспортера цинка, ZIP6, ZIP10 и ZIP14. Показан је специфичан локализациони образац транспортера цинка у компартментима сперматозоида, али и у субћелијским компартментима главе. Добијени резултати су показали да се осим што су оба кода маркери хетерогености сперматозоида, тубулински код се може узети као структурни маркер једарне зрелости и каснијег патерналног доприноса, а цинк код се може узети као маркер зрелости сперматозоида. Такође, резултати су показали разлику између нормо- и астенозооспермичних сперматозоида. Наиме, астенозооспермични сперматозоиди су показали

низак степен ацетилације α -тубулина и његовог присуства у једру, као и снижену и субкомпаратментално различиту експресију ZIP6 и ZIP14 у глави.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња критички разматра приказане резултате поредећи их са подацима других аутора. Литературни подаци за хумане сперматозиде су изузетно оскудни за оба истраживана кода, али је кандидаткиња дала одговоре на задатке постављене у циљевима. У првом делу су дискутовани резултати хетерогености тубулинског кода кроз ацетилацију специфичног места на α -тубулину, како у репу, тако и у глави сперматозоида. У светлу показатеља финих разлика на молекулском нивоу, кандидаткиња дискутује показане варијације у субћелијској локализацији α -тубулина у глави и репу доводећи их у везу са подацима из литературе о транслокацији овог протеина током различитих физиолошких и патолошких стања у другим ћелијама. На крају овог дела кандидаткиња дискутује значај отворености хроматина за транскрипционе факторе и сугерише предност сперматозоида који имају α -тубулин у једру код патерналног доприноса зиготу. Ово је први податак ове врсте у литератури до сада.

У наставку, кандидаткиња прелази на дискутовање показаних сличности и разлика у цинк коду, експресији и локализацији транспортера цинка. С обзиром да је код ејакулираних хуманих сперматозоида једино показано имуноприсуство ZIP10, јасно је да је кандидаткиња имала захтеван задатак да дискутује комплексне и по први пут показане резултате за компартменталну и субкомпаратменталну локализацију сва три ZIP. Ове важне резултате о јасној разлици у цинк коду у астенозооспермичним узорцима кандидаткиња у потпуности ставља у контекст временског следа уношења цинка у различите компартменте и субкомпаратменте сперматозоида, наглашавајући да су они повезани са стицањем компетентности за оплодњу. Коначно, кандидаткиња дискутује и будуће правце истраживања и значај ове студије за примену у превазилажењу мушке неплодности и/или побољшању успешности оплодње путем ИУИ.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња на јасан начин изводи закључке који у потпуности произлазе из добијених резултата и који дају одговоре како ћелијски и молекулски основ хетерогености хуманих сперматозоида кроз тубулински и цинк код разликује астенозооспермичне у односу на нормозооспермичне узорке.

У односу на тубулински код показано је изразито присуство ацетилованог α -тубулина у једру нормозооспермичних узорака у поређењу са његовом слабом заступљености у астенозооспермичним узорцима. С обзиром да је једарни тубулин повезан са хроматином, да интерагује са хистонима, линкерима и коактиваторима транскрипције *in vitro*, добијени резултати сугеришу да би један од маркера слабе успешности астенозооспермичних сперматозоида био и снижени патернални допринос зиготу.

Након обраде за ИУИ, имунолокализација ацетилованог α -тубулина је била видљива само у средњем делу и репу астенозооспермичних ћелија у поређењу са нормозооспермичним. Већа имунопозитивност ацетилованог α -тубулина у репу сперматозоида астенозооспермичних узорака сугерише могућу субкомпаратменталну транслокацију ацетилације из једра у реп. Ацетилувани α -тубулин у једру сперматозоида могао би бити нови биомаркер, поред оних који се тренутно користе, како би се побољшао успех ИУИ процедура у будућности.

У односу на цинк код, хетерогеност међу сперматозоидима у нормозооспермичним и астенозооспермичним узорцима у односу на компартменталну и субкомпаратменталну имунолокализацију ZIP је висока. Генерална имунопозитивност за ZIP6 и ZIP14 је снижена у астенозооспермији у поређењу са нормозооспермијом, док је за ZIP10 остала непромењена. ZIP6 и ZIP14 су нађени у глави, док је ZIP10 локализован дуж репа. Снижена експресија ZIP6 у астенозооспермичним узорцима могла би бити један од маркера зрелости сперматозоида.

Субкомпаратментална локализација је изражена за ZIP6 и ZIP14 у глави, за ZIP6 изражена у антериорном и постериорном региону главе, док је за ZIP14 уочена само у антериорном делу. Како је неактивност хроматина у ејакулираним сперматозоидима хетерогена, као и концентрација једарног Zn^{2+} , утицај астенозооспермије на сперматозоиде се не одражава само у њиховој смањеној покретљивости, већ и на релативни једарни интегритет/стабилност.

Локализација ZIP6 у средњем делу неких ћелија није потпуно јасна у односу на улоге Zn^{2+} у том делу сперматозоида. Реп сперматозоида показао је имунопозитивност на ZIP10, такође и на ZIP14, али мању код астенозооспермије. Повезаност концентрације Zn^{2+} и покретљивости репа је контрадикторна, тако да су потребна даља истраживања да би се открила његова јасна улога.

Ово је прва студија која указује на разлике између појединачних сперматозоида на ћелијском и молекулском нивоу. У ери индивидуализованог приступа пацијенту у медицини, резултати добијени у овој дисертацији говоре о јединствености појединачних сперматозоида, међу којима само један може оплодити ооциту. Чак и најмање промене у једном сперматозоиду могу бити специфичан молекулски потпис кључан за потенцијалну предност или неуспех оплодње.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи списак 86 библиографских јединица и 2 интернет странице. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Protic I**, Golic I, Vidakovic S, Korac B, Korac A. (2022). Heterogeneous immunolocalisation of zinc transporters ZIP6, ZIP10 and ZIP14 in human normo- and asthenozoospermic spermatozoa. *Current Issues in Molecular Biology*, 44, 3444–3454. (M23) <https://doi.org/10.3390/cimb44080237>
2. **Protic I**, Golic I, Aleksic M, Vidakovic S, Korac B, Korac A (2022). Presence of acetylated alpha-tubulin in human sperm nuclei: A contributor to sperm heterogeneity. *Medical Hypotheses*, 161, 110800. (M22) <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2022.110800>

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Исидоре С. Протић** послата је дана **02.08.2022.** године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана **02.08.2022.** године. Резултати електронске провере докторске дисертације показују да индекс подударности износи 9%. Детаљним увидом у Извештај утврђено је да се уочене подударности текста односе на: поједине речи као што су стандардне скраћенице и енглеске називе, библиографске податке о коришћеној литератури и њихово навођење у тексту, на афилијацију и звања чланова комисије, биографију кандидата, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, изјаву о коришћењу, као и коришћење кратких фраза уобичајених у српском језику, што све припада групи нужног подударња и у складу је са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“ број 201/18).

Када се све изнето узме у обзир, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Исидоре С. Протић**, под насловом „**Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида**“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Исидоре С. Протић**, под насловом „**Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида**“, представља прву студију ове врсте у свету. Комисија је мишљења да докторска дисертација **Исидоре С. Протић** својом темом, постављеним циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос разумевању ћелијске и молекулске хетерогености сперматозоида како на структурном, тако и на функцијском нивоу. Допринос кандидаткиње огледа се и у оригиналним протоколима и дизајну експеримента за анализу тубулинског и цинк кода на нивоу једне ћелије.

Комисија посебно жели да истакне посвећеност кандидаткиње да осмисли и истраје на истраживањима која ће, иако нимало лака, кроз расветљавање базичних проблема ћелијске и молекуларне биологије омогућити њихову примену у побољшању успешности ИУИ и превазилажењу мушке неплодности. Отворени нови истраживачки правци такође потврђују квалитет и научни допринос постигнутих резултата кандидаткиње.

Имајући у виду све напред наведено, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Исидори С. Протић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида**“.

КОМИСИЈА:

др Бато Кораћ, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Лидија Тулић, доцент
Универзитет у Београду-Медицински факултет

др Игор Голић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

У Београду, 04.08.2022. године.