

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 8.9.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Небојше Јаснића и др Татјане Костић о урађеној докторској дисертацији **Срђана Ј Сокановића**, асистента запосленог на Природно-математичком факултету у Новом Саду, под насловом „**Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине функције Лајдигових ћелија током старења**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. др Татјана Костић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
2. др Силвана Андрић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
3. др Небојша Јаснић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Срђана Ј Сокановића под насловом „**Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине функције Лајдигових ћелија током старења**“, написана је на 135 страна, и подељена у 7 поглавља: Увод (28 страна), Циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (17 страна), Резултати (38 страна), Дискусија (15 страна), Закључци (4 стране) и Литература (24 стране). Рад садржи 265 литературних цитата, 32 слике, 7 табела, Сажетке на српском и енглеском језику и Садржај.

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у Лабораторији за репродуктивну ендокринологију и сигналинг, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду.

Анализа докторске дисертације:

У **ПРЕДГОВОРУ** (1 страна) кандидат уводи читаоца у проблематику старачког хипогонадизма, говори о последицама које настају услед смањене продукције тестостерона, објашњава разлоге и истиче неопходност истраживања репродуктивног старења на животињским моделима.

Поглавље **УВОД** (28 страна и 4 слике) је подељено у 3 целине:

1.1. Ендокрина функција Лајдигових ћелија и примарна регулација сАМР сигнализацијом садржи информације о функцији Лајдигових ћелија укључујући детаљан приказ биосинтезе тестостерона, мобилизације холестерола и улогу лутеинизирајућег хормона (LH) у иницирању стероидогенезе. Описани су елементи сАМР-PRKA сигналног пута као доминантног пута укљученог у акутну и хроничну контролу синтезе тестостерона.

1.2. Други сигнални путеви који регулишу ендокрину функцију Лајдигових ћелија садржи преглед литературних података о укључености других сигналних путева у регулацију/модулацију биосинтезе тестостерона. Посебна пажња је посвећена NO-cGMP-PRKG и MAPK сигнализацији и њиховој укључености у регулацију функције Лајдигових ћелија.

1.3. Старење је потпоглавље посвећено универзалном биолошком феномену старења и актуелним хипотезама о настанку старења. Приказана су актуелна знања о Лајдиговим ћелијама старог фенотипа са информацијама о измењеној морфологији и функцији митохондрија као и променама окружења Лајдигових ћелија које индиректно доприносе њиховој субфункционалности током старења. Приказани литературни подаци указују на многа нерешена питања и отворен простор за даља истраживања која би имала за циљ боље разумевање хипофункције Лајдигових ћелија током старења организма. У последњем делу потпоглавља дефинисана је андропауза и описан начин њеног дијагностиковања. Наведени су психо-физички проблеми изазвани смањеним нивоом тестостерона и укратко објашњена потреба за истраживањем Лајдигових ћелија старог фенотипа као и неопходност поспешивања ендogene продукције тестостерона у старијем животном добу мушкараца.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** (2 стране) дефинисана су два основна циља истраживања која се односе на: 1. карактеризацију старачког хипогонадизма код пацова соја *Wistar* као модела за истраживање репродуктивног старења; 2. испитивање удела промена сАМР- и сGMP-сигнализације у формирању старог фенотипа Лајдигових ћелија.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ (17 страна, 2 слике, 2 табеле) садржи информације о хемикалијама коришћеним у раду, условима гајења експерименталних животиња као и детаљан опис *in vivo* експерименталних модела хроничне и акутне инхибиције PDE5 као и *ex vivo* експеримената на Лајдиговим ћелијама пореклом од пацова различитих старосних категорија. Фазе експерименталних поступака су сумиране у одговарајућим

шематским приказима. Описане су методе коришћене приликом одређивања биохемијских и физиолошких параметара (експресија транскрипата, протеина, функционалност рецептора и ензима, ниво хормона у циркулацији, секундарних гласника у ћелијама итд). Примењене методе су поуздане и адекватне за остваривање описаних експерименталних поставки и циљева истраживања. На крају поглавља су наведене статистичке анализе коришћене за обраду података.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** (38 страна, 23 слике, 5 табела) подељено је у три потпоглавља.

4.1. Карактеризација ендокрине функције Лајдигових ћелија старог фенотипа код *Wistar* пацова садржи резултате који илуструју ендокрине промене гонадне осовине и стероидогеног капацитета Лајдигових ћелија током старења *Wistar* пацова. Потврђено је да се ниво LH у циркулацији не мења значајно током старења иако после дванаестог месеца започиње прогресивно смањивање стероидогеног капацитета Лајдигових ћелија као и смањено експримирање *Ins13/INSL3* (маркер функционалности Лајдигових ћелија). Хипофункција Лајдигових ћелија праћена је смањеном осетљивошћу на гонадотропине као и смањеном активношћу и експресијом стероидогених елемената.

4.2. Утицај старења на ћелијску сигнализацију која регулише синтезу тестостерона је потпоглавље које садржи анализу сигнализације три основна сигнална пута: LH-сAMP-PRKA, MAPK и NO-сGMP-PRKG. Анализом је обухваћена временска динамика промена експримирања елемената сва три сигнална пута као и њихов допринос смањеној функционалности Лајдигових ћелија. Стари фенотип Лајдигових ћелија је праћен смањењем унутарћелијског сAMP, поремећеним експримирањем сAMP-зависних фосфодиестераза као и повећаним експримирањем ADCY10. *Ex vivo* испитивањима установљена је значајна улога фосфодиестераза у смањењу нивоа сAMP, али и то да смањен ниво сAMP није једини узрочник смањене стероидогене функције Лајдигових ћелија током старења *Wistar* пацова. Детектоване су и значајне промене експримирања и активности компонената MAPK сигналног пута, и *ex vivo* приступом је показана независност ових промена од нивоа сAMP у ћелијама старих животиња. Мерењем продукције нитрита, сGMP као и анализом експримирања гена, установљена је повећана активност NO-сGMP-PRKG сигналног пута у Лајдиговим ћелијама старог фенотипа. *Ex vivo* испитивањима установљено је да сGMP независно од NO стимулише стероидогенезу у Лајдиговим ћелијама старог фенотипа, док NO испољава супротан ефекат. Затим су анализирани *ex vivo* и *in vivo* (акутни и хронични) ефекти силденафила (Виагра, специфични инхибитор PDE5) на стероидогени капацитет и сигналну трансдукцију Лајдигових ћелија старог фенотипа. Према представљеним резултатима третман је позитивно утицао на стероидогени капацитет Лајдигових ћелија, нормализовао је експримирање компонената и активност NO-сGMP-PRKG сигналног пута и смањено експримирање *Pde* одговорних за разградњу сAMP и сGMP.

4.3. Утицај старења на енергетску хомеостазу Лајдигових ћелија садржи резултате који илуструју промену енергетске хомеостазе Лајдигових ћелија током старења *Wistar* пацова. Старење Лајдигових ћелија прате промене енергетске хомеостазе и промене функционалности митохондрија исказане смањеном потрошњом кисеоника, повећаном продукцијом АТФ, хиперполаризацијом митохондријских мембрана и променом

експримирања неких гена одговорних за регулацију енергетске хомеостазе. У овом делу дисертације је анализиран *ex vivo* и *in vivo* ефекат cAMP- и cGMP-сигнализације на параметре митохондријске функционалности и продукцију АТР у Лајдиговим ћелијама старих пацова. Резултати су указали да акутна и хронична инхибиција PDE5 нормализује старењем изазване промене митохондријске активности и експримирање неких гена укључених у регулацију функције митохондрија.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** (15 страна, 3 слике) је подељено у три целине, које, употпуњене литературним подацима, утемељују добијене резултате у општи скуп научних знања. Поглавље започиње анализом узрочно последичне везе између ниског нивоа тестостерона и психико-физичких проблема индивидуе, након чега се описују проблеми дијагностиковања андропаузе и образлажу позитивни ефекти заменске терапије тестостроном у њеном третману. Објашњава се ограниченост употребе актуелних животињских модела у проучавању андропаузе и могућност екстраполације резултата на хуману популацију. Кандидат истиче потребу за сталним усавршавањем *in vivo* модела и објашњава избор *Wistar* пацова као модел организма за истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације.

У делу 5.1., **Старење и промене ендокрине функције Лајдигових ћелија *Wistar* пацова**, објашњена је смањена андрогена функција Лајдигових ћелија у условима непромењеног нивоа LH. Представљени резултати поређени су са демографским подацима и резултатима добијеним на *Brown Norway* пацовима. Кандидат анализира добијене резултате измењене активности и експримирања елемената стероидогене машинерије поредећи их са резултатима добијеним на другим експерименталним моделима.

Део 5.2., **Старење и промене ћелијске сигнализације укључене у регулацију синтезе тестостерона**, анализира добијене резултате измењене ћелијске сигнализације у светлу актуелних теорија старења. Дискутован је пад продукције cAMP у Лајдиговим ћелијама старих *Wistar* пацова и ефекти на контролу стероидогенезе. Анализиране су промене MAPK сигналног пута у условима повећане продукције ROS као једног од обележја Лајдигових ћелија старог фенотипа. Представљени резултати поређени су са налазима измењене MAPK сигнализације у другим стероидогеним и нестероидогеним ћелијама. Измењена NO-cGMP-PRKG сигнализација у ћелијама старог фенотипа је анализирана са аспекта различитих ефеката повишене продукције NO и cGMP на синтезу тестостерона. Дискутовани су ефекти акутне и хроничне инхибиције PDE5 (силденафилом) на успоравање старења посматрано кроз успоравање стопе пада тестостерона.

У последњој целини, 5.3. **Старење и енергетска хомеостаза Лајдигових ћелија**, кандидат дискутује промене енергетске хомеостазе током старења Лајдигових ћелија уз претпостављање везе између измењене редокс средине, повећане продукције NO, промена васкуларизације тестиса и измењене функционалности митохондрија. У светлу литературних навода дискутован је позитиван ефекат cGMP и третмана са силденафилом на функционалност митохондрија.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** (4 стране) сумирани су резултати добијени у овом раду, а који описују стари фенотип Лајдигових ћелија укључујући измењену сигнализацију и енергетску хомеостазу као и cAMP- и cGMP-зависне механизме укључене у његово

настајање.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** (24 стране) дата је листа коју чини 265 библиографских јединица. Наведене научне публикације се односе на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Sokanovic SJ, Baburski AZ, Janjic MM, Stojkov NJ, Bjelic MM, Lalosevic D, Andric SA, Stojilkovic SS, Kostic TS (2013) The opposing roles of nitric oxide and cGMP in age-associated decline in the rat testicular steroidogenesis. *Endocrinology*. 154(10):3914-24. **(M21)**
2. Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov NJ, Baburski AZ, Bjelic MM, Andric SA, Kostic TS (2014) Age related changes of cAMP and MAPK signaling in Leydig cells of Wistar rats. *Exp. Gerontol*. 58:19-29. **(M21)**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Sokanovic SJ, Baburski AZ, Janjic MM, Stojkov NJ, Bjelic MM, Andric SA, Stojilkovic SS, Kostic TS (2013) The opposite roles of nitric oxide and cGMP in age-associated decline in rat testicular androgenesis. 3rd IRB Barcelona PhD Student Symposium “*The clock of life: cellular and molecular processes of development, ageing and disease*”. Barcelona, Spain. November 14-15. **(M34)**
2. Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov NJ, Baburski AZ, Bjelic MM, Andric SA, Kostic TS (2014) Age related changes of cAMP and MAPK signaling in Leydig cells of Wistar rats. *2nd EYES meeting*, Belgrade, Serbia. September 24-26. **(M34)**
3. Sokanovic SJ, Vukic DV, Kojic Z, Andric SA, Kostic TS (2016) Primary hypogonadism in the old male Wistar rats is associated with age related mitochondrial dysfunction. 9th Congress of the European Academy of Andrology, Rotterdam, Netherlands. September 21-23. **(M34)**
4. Sokanovic SJ, Andric SA, Kostic TS (2017) Primary hypogonadism in the old male wistar rats is accompanied by cAMP and MAPK signaling disturbances. New perspectives in physiological research – young investigator forum. Subotica, Serbia. May 25-27. **(M34)**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Sokanovic SJ, Baburski AZ, Janjic MM, Stojkov NJ, Bjelic MM, Andric SA i Kostic TS (2013) Azot oksid i cGMP imaju suprotnu ulogu u regulaciji testikularne steroidogeneze kod starih pacova. *Drugi kongres „Život sa slobodnim radikalima-Hemija-biologija-medicina-*. Niš, Srbija. Septembar, 28. 2013. **(M64)**

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација кандидата Срђана Ј Сокановића, под насловом „Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине функције Лајдигових ћелија

током старења“ представља вредан и аутентичан научни рад који доприноси бољем разумевању процеса који прате репродуктивно старење мужјака и развој старачког хипогонадизма који за последицу има смањену функционалност Лајдигових ћелија и смањену продукцију тестостерона.

Јасно дефинисане циљеве, који су засновани на добром познавању научне проблематике, пратила је успешна реализација истраживачког поступка.

На основу увида у истраживање и постигнуте резултате, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Срђана Ј Сокановића, под насловом „Механизми укључени у регулацију смањене ендокрине функције Лајдигових ћелија током старења“ и омогући кандидату јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

1. др Татјана Костић, редовни професор,
Природно-матеметички факултет, Универзитет у Новом Саду

2. др Силвана Андрић, редовни професор,
Природно-матеметички факултет, Универзитет у Новом Саду

3. др Небојша Јаснић, ванредни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

У Београду, 05.10.2017. године.