

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10
11 Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 197.
12 sednici održanoj 26.06.2019. godine.

13
14 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
15 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
16 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

17 **Napomena:** redosled članova Komisije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim
18 članovi iz drugih institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada
19 se mentor iz druge institucije upisuje pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM
20 koji je pod rednim brojem 1.

- 21
22
23 1. Dr Sunčica Borozan, redovni profesor, (Hemija-biohemija, 2011. godina), Fakultet
24 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu - mentor 1.
25
26 2. Dr Andreja Prevendar Crnić, redovni profesor, (Toksikologija, 2015. godina),
27 Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu - mentor 2.
28
29 3. Dr Saša Ivanović, docent, (Farmakologija i toksikologija, 2015. godina), Fakultet
30 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
31
32 4. Dr Sanja Dacić, docent, (Fiziologija životinja i čoveka, 2014. godina), Katedra za
33 opštu fiziologiju i biofiziku, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu,
34
35 5. Dr Sanja Peković, naučni savetnik, (Neurobiologija, 2008. godina), Odeljenje za
36 neurobiologiju, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u
37 Beogradu.
38
39

40 II PODACI O KANDIDATU:

41
42 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

43
44 Dejana, Vitomir, Ćupić Miladinović
45

46 2. Datum rođenja, opština, Republika:

47
48 30.12.1983., Beograd, Savski venac, Srbija
49

50 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

51
52 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

53
54 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

55
56 „ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG I ANTIINFLAMATORNOG POTENCIJALA VITAMINA
57 B1 KOD JAPANSKIH PREPELICA (*COTURNIX JAPONICA*) SUBAKUTNO TRETIRANIH
58 HLORPIRIFOSOM“
59

1
2 **IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,**
3 **grafikona i sl.):**
4

5 Doktorska disertacija je napisana na 209 strane, podeljena u osam poglavlja: Uvod (5
6 strana), Pregled literature (49 strana), Cilj i zadaci (2 strane), Materijal i metode (16 strana),
7 Rezultati (68 strane), Diskusija (25 strana), Zaključci (3 strane) i Spisak literature (441
8 referenca), Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog
9 rada, Izjava o korišćenju. Tekst disertacije prati 21 slika, 46 grafikona i 57 tabelarnih prikaza
10 podataka.

11
12 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
13 **svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i**
14 **zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**
15 **nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u**
16 **doktorskoj disertaciji):**

17 U **Uvodu** kandidat iznosi značaj izučavanja efekata trovanja hlorspirifosom (CPF), kao
18 i naknadnu primenu vitamina B1 kao mogućeg protektora. Danas se u svetu svakodnevno
19 koristi veliki broj pesticida, a usled velike efikasnosti, organofosfatna jedinjenja su
20 najzastupljenija. Među najčešće korišćene insekticide spada i CPF, čijom se neracionalnom i
21 nepravilnom primenom dešavaju česta trovanja životinja, a pre svega ptica. CPF deluje
22 toksično na najmanje tri načina: inhibicijom aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE),
23 izazivanjem oksidativnog stresa i izazivanjem funkcionalnog poremećaja endokrinih žlezda.
24 CPF privlači sve veću pažnju, zahvaljujući saznanjima da utiče na zdravlje ljudi, a posebno
25 dece. Izlaganje CPF-u može izazvati oštećenje jetre i poremećaje u njenoj metaboličkoj
26 funkciji. Takođe je primećeno da CPF ima svojstva potentnog neurotoksina (dovodi do niza
27 neuropsiholoških efekata, uključujući perifernu i centralnu neuropatiju i neurokognitivne
28 deficite), kao i da deluje imunotoksično.

29 Vitamin B1 (tiamin) spada u grupu hidrosolubilnih vitamina, koji se ne sintetiše u
30 organizmu sisara, pa se mora unositi hranom. Preko acetil koenzima A (acetil-CoA) tiamin
31 učestvuje u sintezi acetilholinesteraze, a njegov nedostatak potencira delovanje
32 organofostata. Vitamin B1 je neophodan i za normalno funkcionisanje nervnog tkiva, jer
33 učestvuje i u neurohumoralnoj transmisiji. Ovaj vitamin svoje antioksidativno delovanje
34 ostvaruje inhibicijom nastanka lipidne peroksidacije i slobodnih radikala, koji nastaju
35 oksidacijom nezasićenih masnih kiselina ćelijskih membrana. Tokom aerobnog metabolizma
36 neprestano se stvaraju slobodni radikali, a da bi se očuvala ravnoteža u organizmu, oni se
37 moraju stalno i uklanjati. Ukoliko dođe do porasta koncentracije slobodnih radikala, nastaju
38 oštećenja ćelija usled oksidativnog stresa. Imajući u vidu povezanost neuroinflamacije i
39 povećane produkcije azot monoksida i reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i stvaranje veoma
40 reaktivnih azotovih vrsta, može se pretpostaviti da vitamin B1 ima izvesnu i antiinflamatornu
41 aktivnost, koju smo težili da dokažemo.
42

43 U poglavlju **Pregled literature**, sistematski se navode publikovani podaci vezani za
44 istorijat, toksikokinetiku, biotransformaciju i mehanizam delovanja organofosforinih jedinjenja
45 kao i samog CPF-a. Poseban osvrt je dat na efekte CPF-a koje ostvaruje ireverzibilnom
46 inhibicijom aktivnosti enzima holinesteraza. Interesantan je podatak iz literature koji opisuje
47 da samo u Kini postoji čak 1 022 registrovana preparata, koji sadrže CPF kao i da je 2013.
48 godine proizvodnja ovog pesticida u Kini prelazila 200 000 tona godišnje. Predstavljani su
49 literaturni podaci koji se odnose na ograničenja primene CPF-a, s obzirom da je potvrđen
50 njegov uticaj na zdravlje ljudi, a pre svega dece. U Evropskoj uniji (EU) je upotreba CPF
51 odobrena do 30. januara 2020. godine, nakon čega će ići na reevaluaciju. Obuhvaćeni su
52 podaci iz literature koji se odnose i na toksične efekte CPF-a na jetru, nervni i imuni sistem,
53 kao i na metaboličke procese.

54 Pored toga, detaljno su predstavljeni podaci iz literature koji se tiču efekata CPF-a na
55 životnu sredinu i životinjski svet a pre svega na ptice. Opisano je da je veoma toksičan za
56 ribe, a umereno do veoma toksičan za vodozemce i vodene beskičmenjake (uticao je na
57 izumiranje populacije žaba u SAD). Postoji opravdana zabrinutost da bi kontinuirano
58 subletalno izlaganje CPF-u moglo smanjiti brojnost ptica, usled negativnog uticaja na
59 fiziološke procese, ali i suprimirajućeg delovanja na letenje. U literaturi je navedeno da je
60 LD₅₀ CPF 10 mg/kg za vrapce; 8,41 mg/kg za fazane; 136-203 ppm-a za patke i 17,8 mg/kg

1 za preeplice. Između 1974. i 2005. godine, pretpostavlja se da je CPF bio uzročnik 79
2 akcidentalnih trovanja, koja su za posledicu imala uginuća uglavnom ptica i pčela.

3 U poglavlju Pregled literature kandidat daje poseban osvrt na farmakokinetiku i
4 farmakodinamiku, kao i antioksidativno dejstvo vitamina B1. Tiamin je neophodan i za
5 normalno funkcionisanje nervnog tkiva i neurohumoralnu transmisiju pošto nedostatak tiamina
6 dovodi do poremećaja metabolizma glavnih neurotransmitera, acetilholina i glutamata. Preko
7 sinteze acetyl CoA učestvuje u sintezi AChE. Usled toga, nedostatak tiamina ima za posledicu
8 smanjenu sintezu AChE, što dovodi do potenciranja negativnog delovanja organofosfata.
9 Kada se prekine unošenje tiamina simptomi deficita se javljaju za 1 nedelju kod golubova, za
10 10 dana kod pacova, a za 3 do 4 nedelje kod pasa. Antioksidativno delovanje vitamin B1
11 ostvaruje inhibicijom lipidne peroksidacije i oksidacije slobodnih radikala. Pored toga, kao
12 koenzim transketolaze neophodan je za normalnu sintezu masti i holesterola, kao i za
13 očuvanje integriteta ćelijske membrane.

14 Takođe su navedeni podaci iz literature koji se odnose na pojavu oksidativnog stresa
15 i procesa apoptoze izazvanih CPF-om, kao i mehanizmi odbrane od oksidativnog stresa.

16
17 **U cilju** ispitivanja mehanizama toksičnosti CPF-a, kod subakutno tretiranih japanskih
18 prepelica, nakon primene subletalnih doza, kao i potencijalno zaštitnog efekta vitamina B1,
19 primenjenog neposredno nakon davanja CPF-a, postavljeni su sledeći zadaci:

- 20 ▪ Ispitati promene oksido-redukcionih parametara u plazmi, tkivu jetre i mozga
21 prepelica.
- 22 ▪ Na osnovu dobijenih rezultata proceniti ulogu slobodnih radikala u mehanizmu
23 toksičnog delovanja CPF-a.
- 24 ▪ Ispitati aktivnost enzima acetilholinesteraze i butirilholinesteraze u eritrocitima,
25 odnosno plazmi, tkivu jetre i mozga prepelica nakon tretmana različitim dozama
26 CPF-a.
- 27 ▪ Ispitati ukupnu proteinsku raspodelu u krvi sa posebnim osvrtom na lipoproteine
28 ApoA i ApoB nakon tretmana različitim dozama CPF-a i proceniti njihovu
29 povezanost sa arilesterazama.
- 30 ▪ Ispitati ekspresiju *inducibilne* azot-oksida sintaze (iNOS), c-Jun N- terminalne
31 kinaze (JNK), ciklooksigenaze (COX-2), kinaze čija je aktivnost regulisana
32 vanćelijskim signalima (ERK1,2), kao i b-ćelijskog limfoma (Bcl-2) u mozgu i time
33 proceniti uticaj CPF-a na uvođenje ćelija u apoptozu.
- 34 ▪ Ispitati i analizirati antioksidativni, antiapoptotski, antiinflamatorni i potencijalno
35 protektivni efekat vitamina B1 nakon tretmana različitim dozama CPF-a na
36 osnovu:
 - 37 - biohemijskih parametara izazvanih oksidativnim stresom,
 - 38 - aktivnosti enzima AChE i BuChE u plazmi, tkivu jetre i mozga prepelica,
 - 39 - parametara uključenih u apoptozu,
 - 40 - sinteze citokina,
 - 41 - totalnog oksidativnog kapaciteta vitamina B1.

42
43 **Materijal i metode:** Kao materijal za izradu ove doktorske disertacije korišćeni su
44 eritrociti, plazma, tkiva jetre i mozga prepelica. Ispitivanje je rađeno na osamdeset mužjaka
45 Japanske prepelice (2 kontrolne grupe i 6 eksperimentalnih, n=10/grupi) starosti 3-4 nedelje,
46 telesne mase 200 ± 30 g. Jedna kontrolna grupa je primala kukuruzno ulje, dok je drugoj
47 aplikovan samo vitamin B1. Tokom tretmana koji je trajao 7 dana, pticama je jednom dnevno
48 aplikovan, u kukuruznom ulju rastvoren CPF *per os* u dozama od 1,50 mg/kg telesne mase
49 (t.m.); 3,00 mg/kg t.m. i 6,00 mg/kg t.m. Preostale tri grupe su dobijale vitamin B1
50 intramuskularno (i.m.) u dozi od 10 mg/kg t.m., pola sata nakon aplikacije CPF-a u prethodno
51 navedenim dozama. Sve životinje su žrtvovane osmog dana metodom dekapitacije.

52 U skladu sa postavljenim ciljem i zadacima, primenjene su različite laboratorijske tehnike i
53 metode:

- 54 • Spektrofotometrija - za određivanje aktivnosti enzima kao i koncentracije parametara
55 oksidativnog stresa - (katalaze (CAT), glutation-S-transferaze (GST), redukovano

1 glutationa (GSH), malondialdehida (MDA), vodonik peroksida (H_2O_2); određivanje
2 aktivnosti holinesteraza (AChE i BuChE); određivanje aktivnosti arilesteraze (ARE),
3 određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO), određivanje koncentracije
4 lipoproteina (ApoA i ApoB), antioksidativne sposobnosti vitamina B1 (DPPH i
5 redukciona moć), kao i osmotske fragilnosti eritrocita.

- 6 • Nedenaturišuća ili nativna poliakrilamid gel elektroforeza (*eng.* Native PAGE) – za
7 određivanje relativne koncentracije proteina u krvnoj plazmi, određivanje realativne
8 aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH), kao i ukupne superoksid dismutaze (SOD),
9 bakar,cink-superoksid dismutaze (Cu,Zn-SOD, SOD1), mangan-superoksid
10 dismutaze (Mn-SOD, SOD2).
- 11 • ELISA test - za određivanje koncentracije nitrita (NO_2^-), koncentracije proinflatornih
12 citokina IL-1 i IL-6.
- 13 • Imunohemija - za određivanje ekspresije enzima inducibilne azotoksid sintaze
14 (iNOS), c-jun n-terminalne kinaze (JNK), vanćelijskim signalima regulisane kinaze
15 (*eng.* *Extracellular signal-regulated kinases* - ERK), ciklooksigenaze (COX-2),
16 katalaze (CAT), b-ćelijskog limfoma (Bcl-2).

17
18
19 Dobijeni rezultati prikazani su deskriptivnim statističkim parametrima (aritmetička
20 sredina, standardna devijacija, standardna greška, minimalna, maksimalna vrednost i
21 koeficijent varijacije), koji su omogućili opisivanje dobijenih rezultata i njihovo tumačenje. Pre
22 statističke analize parametri su testirani na normalnu distribuciju upotrebom D'Agostino-
23 Pearson omnibus testa. Statistička značajnost utvrđena je upotrebom jednofaktorskog
24 ANOVA testa, sa Tukey post-hoc testom. Za denzitometrijska merenja intenziteta traka,
25 korišćen je program Total Lab TL120, nakon PAGE. Signifikantnost razlika utvrđena je na
26 nivoima značajnosti od $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$; $p < 0,0001$. Dobijeni rezultati su prikazivani
27 tabelarno i grafički. Za statističku analizu je korišćen program GraphPad Prism 7.00 (San
28 Diego, Ca, USA).

29
30 U **Rezultatima** preko PAG elektroforeze dokazana je povećana aktivnost SOD1 u
31 eritrocitima sa prve dve doze CPF-a ($p < 0,0001$), dok je u dozi od 6 mg/kg CPF zabeležen
32 pad aktivnosti enzima ($p < 0,05$). Vitamin B1 je doveo do smanjenja aktivnosti ovog enzima,
33 vraćajući ih na kontrolni nivo ($p > 0,05$). U jetri, primena CPF-a kao i naknadna aplikacija
34 vitamina B1, nije dovela do statistički značajnih promena ukupne aktivnosti SOD-a. Takođe,
35 pokazali smo da CPF inhibira SOD1 ($p < 0,01$) dok B1 vraća aktivnost enzima na kontrolni
36 nivo. Aktivnost enzima SOD2 je povećana nakon tretmana CPF-om ($p < 0,05$), a dodatno
37 povećanje je uzrokovano tretmanom vitaminom B1. Primetan je značajni pad aktivnosti SOD2
38 nakon tretmana sa najvišom dozom CPF-a od 6 mg/kg ($p < 0,001$). U mozgu, ukupna
39 aktivnost SOD i SOD1 je značajno povećana ($p < 0,05$) kod prepelica koje su tretirane CPF-
40 om, ali i kod prepelica koje su nakon CPF-a dobile vitamin B1 ($p < 0,0001$).

41 Dokazan je porast aktivnosti CAT usled dejstva CPF-a u plazmi ($p < 0,05$), jetri ($p <$
42 $0,0001$) i mozgu ($p < 0,0001$) prepelica u svim ispitivanim dozama. Tretman vitaminom B1 je
43 smanjio aktivnost CAT sa najboljim efektom u jetri u odnosu na tretman CPF-om u sve tri
44 ispitivane doze ($p < 0,05$), ali su vrednosti i dalje bile povećane u odnosu na kontrolu.

45 S obzirom da je ekspresija CAT u mozgu bila povećana ($p < 0,0001$) u grupama
46 tretiranim CPF-om i vitaminom B1, a i na njenu veoma nisku aktivnost u fiziološkim uslovima
47 u mozgu, određivali smo koncentraciju H_2O_2 u ovom tkivu. U našim istraživanjima pokazano je
48 da aplikacija CPF-a dovodi do povećanja koncentracije H_2O_2 ($p < 0,0001$), dok je posle
49 tretmana vitaminom B1 došlo do značajnog pada koncentracije između tretiranih grupa ($p <$
50 $0,0001$) u svim ispitivanim dozama. Iako je primena samo vitamina B1 povećala koncentraciju
51 H_2O_2 u tkivu mozga u odnosu na kontrolnu grupu, koncentracija je bila značajno manja u
52 poređenju sa vrednostima u CPF i CPF+B1 grupama ($p < 0,0001$).

53 Ovo ispitivanje je pokazalo značajno povećanje MDA u eritrocitima prepelica usled
54 dejstva CPF-a, za 3,56 puta (1,50 mg/kg CPF), 3,90 puta (3,00 mg/kg CPF); 4,60 puta (6,00
55 mg/kg CPF) ($p < 0,0001$), dok je tretman vitaminom B1 doveo do pada koncentracije MDA, ali
56 su vrednosti i dalje bile veće u odnosu na kontrolnu grupu. U jetri je CPF doveo do povećanje
57 MDA i najveći efekat dejstva je sa najvećom dozom CPF-a (3,63 puta, $p < 0,0001$). Najbolji
58 efekat naknadnog aplikovanja vitamina B1 je postignut u jetri, gde je smanjenje koncentracije
59 MDA pri najvećoj dozi CPF-a bilo 2,83 puta ($p < 0,0001$), dok je kod grupe tretirane samo
60 vitaminom B1 zabeležena 13,4 puta niža koncentracija MDA u odnosu na kontrolu ($p <$

1 0,0001). Tretman CPF-om u mozgu je izazivao povećanje MDA u sve tri ispitivane doze ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu, ali je nakon aplikovanja vitamina B1 zabeleženo smanjenje MDA na fiziološki nivo. Međutim, treba istaći i da je sam vitamin B1 za 18,56 puta smanjio vrednost MDA u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$).

2
3
4
5 Koncentracija GSH u plazmi je pod dejstvom CPF-a smanjena u sve tri ispitivane
6 doze ($p < 0,0001$). Naknadno aplikovan vitamin B1 je povećao nivo GSH, ali su vrednosti i
7 dalje bile ispod vrednosti dokazanih u kontrolnoj grupi. U jetri je CPF doveo do povećanja
8 GSH ($p < 0,0001$), dok je tretman sa B1 vratio koncentraciju na fiziološki nivo. Najveće
9 povećanje koncentracije GSH zabeleženo je u mozgu nakon aplikacije vitamina B1 u sve tri
10 ispitivane grupe ($p < 0,05$) u odnosu na grupe tretirane CPF-om, kao i u odnosu na kontrolnu
11 grupu ($p < 0,001$). Kod grupe koja je dobijala samo vitamin B1 povećana je koncentracija GSH
12 3,27 puta ($p < 0,0001$) u odnosu na kontrolnu grupu.

13 Ustanovljeno je da CPF primenjen u sve tri ispitivane doze izazvao u plazmi, jetri i
14 mozgu prepelica statistički značajan porast aktivnosti GST-a ($p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,05$).
15 Primena vitamina B1 smanjila aktivnost ovog enzima u plazmi, ali ne i na fiziološki nivo, dok
16 je u jetri dokazano statističko smanjenje u odnosu na grupe tretirane CPF-om ($p < 0,05$). U
17 mozgu došlo do porasta aktivnosti GST-a na istom nivou statističke značajnosti ($p < 0,0001$)
18 kod sve tri ispitivane doze u odnosu na kontrolu.

19 Aktivnost AChE i BuChE posle tretmana CPF-om (sve primenjene doze) značajno je
20 inhibirana u eritrocitima/plazmi, kao i u tkivu jetre i mozga. U eritrocitima je zabeležena
21 inhibicija AChE usled dejstva CPF-a, i kod najveće doze je iznosila 25,50% ($p < 0,05$).
22 Naknadni tretman vitaminom B1 je doveo do vidnog oporavka i povećanja aktivnosti ovog
23 enzima kod prve dve doze CPF-a ($p < 0,05$). Kod kontrolne grupe, koja je tretirana samo
24 vitaminom B1 dokazana je veća aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Inhibicija
25 BuChE u plazmi kod tretmana sa CPF-om iznosila je čak 78,66% pri najvećoj dozi
26 ($p < 0,0001$). Između grupa kojima je nakon CPF-a aplikovan vitamin B1 i onih koje su
27 tretirane samo pesticidom utvrđen je značajan porast aktivnosti BuChE u svim dozama
28 ($p < 0,0001$). Tretman vitaminom B1 kod grupe sa najmanjom dozom CPF-a je povećao
29 aktivnost BuChE na fiziološki nivo, dok su aktivnosti kod druge dve doze CPF-a, povećane za
30 2-3 puta. AChE u jetri je inhibirana kod svih ispitivanih grupa, sa najvećim procentom
31 inhibicije kod najveće doze CPF-a ($p < 0,0001$). Samo je u ovoj dozi nakon tretmana
32 vitaminom B1 pokazano povećanje aktivnosti AChE za 18,19%. Kontrolna grupa tretirana
33 samo vitaminom B1 pokazala je porast aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$).
34 Aktivnost BuChE u jetri je inhibirana dejstvom CPF-a u zavisnosti od doze sa najvećim
35 stepenom inhibicije od 58,93% pri dozi od 6,00 mg/kg CPF ($p < 0,0001$), dok tretman
36 vitaminom B1 nakon CPF-a vraća aktivnost na kontrolni nivo. Kod doza od 3,00 mg/kg i 6,00
37 mg/kg zabeležen je porast aktivnosti enzima za 45,58% i 50,92% ($p < 0,0001$) nakon tretmana
38 sa B1. Sam vitamin B1 je pokazao veću aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu. U mozgu je
39 aktivnost AChE dejstvom CPF-a značajno inhibirana u svim dozama CPF-a ($p < 0,001$).
40 Tretman vitaminom B1 doveo je do povećanja aktivnosti enzima u svim dozama CPF-a i to sa
41 vrednostima koje su bile veće nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,0001$). Aktivnost BuChE u mozgu
42 se, nakon inhibicije CPF-om u svim ispitivanim dozama ($p < 0,01$), uspešno oporavila nakon
43 aplikacije vitamina B1, dok je kontrola sa B1 aktivirala enzim za 60% u odnosu na kontrolnu
44 grupu ($p < 0,0001$). Možemo reći da je tretman vitaminom B1 uticao na aktivnost AChE i
45 BuChE i najbolje efekte pokazao je u mozgu, gde je povećanje iznosilo i do 38,82 puta za
46 AChE, odnosno 3,36 puta za BuChE.

47 Pokazano je da CPF dovodi do značajnog povećanja koncentracije NO_2^- u plazmi,
48 jetri i mozgu ($p < 0,001$). Statistički značajna razlika u plazmi ($p < 0,0001$) u koncentraciji NO_2^-
49 je utvrđena i između sledećih grupa: 1,50 mg/kg CPF i 1,50 mg/kg CPF+B1, 3,00 mg/kg CPF
50 i 3,00 mg/kg CPF+B1; 6,00 mg/kg CPF i 6,00 mg/kg CPF+B1. Kod prepelica kojima je pored
51 CPF-a aplikovan i vitamin B1 u mozgu je došlo do smanjenja koncentracije NO_2^- u odnosu na
52 grupe koje su tretirane CPF-om, ali su koncentracije i dalje bile veće u odnosu na kontrolu. U
53 grupi samo sa vitaminom B1 dokazan pad koncentracija NO_2^- za 39,20% ($p < 0,01$) u odnosu
54 na kontrolu. U jetri je kombinovano delovanje CPF-a i vitamina B1 dovelo do neočekivanog
55 povećanja NO_2^- u odnosu na grupe koje su primile samo CPF, ali i u odnosu na kontrolu.

56 Usled dejstva CPF-a u mozgu prepelica je došlo do značajnog porasta ekspresije
57 iNOS -a ($p < 0,01$). Kod jedinki koje su posle CPF-a primile B1 zabeležen je pad nivoa iNOS -a
58 u odnosu na grupe koje su bile tretirane samo sa CPF-om, ali u odnosu na kontrolu (kod prve
59 i druge doze, $p < 0,05$), i dalje su povećane vrednosti iNOS -a.

1 Zapaženo je značajno povećanje aktivnost MPO u jetri i mozgu kod prepelica koje su
2 bile tretirane CPF-om ($p < 0,001$). U plazmi je aplikacija vitamina B1 održavala inflamatorni
3 odgovor, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na tretman samo pesticidom. U jetri i
4 mozgu smo mogli da primetimo da je vitamin B1 smanjio inflamatorni odgovor indukovano
5 prisustvom toksične supstance, te doveo do smanjenja aktivnosti MPO u odnosu na grupe sa
6 CPF-om ($p < 0,001$) i ($p < 0,01$) i vratio vrednosti ovog enzima na kontrolni nivo.

7 U našem ispitivanju pokazali smo da CPF dovodi do povećanja ERK 1,2 u jetri i
8 mozgu ($p < 0,05$), dok tretman vitaminom B1 u jetri smanjuje ekspresiju ovog enzima ($p <$
9 $0,0001$), u mozgu pak dolazi do značajnog povećanja ($p < 0,001$). Ispitivanjem ekspresije JNK
10 u tkivu mozga došli smo do saznanja da CPF dovodi do povećanja ekspresije ($p < 0,01$), dok
11 naknadna aplikacija vitamina B1 je još dodatno povećava ($p < 0,0001$).

12 U mozgu i jetri COX-2 je povećan usled dejstva različitih doza CPF-a na različitom
13 nivou značajnosti, dok pod uticajem vitamina B1 dolazi do pada u ekspresiji ovog enzima u
14 mozgu ($p < 0,01$) i jetri ($p < 0,0001$) u grupama od 3,00 mg/kg CPF+B1 i 6,00 mg/kg CPF+B1
15 ($p < 0,01$), kao i u grupi tretiranoj samo sa vitaminom B1, u odnosu na kontrolnu grupu ($p <$
16 $0,01$). U našem eksperimentu na prepelicama je dokazano da CPF izaziva smanjenje
17 ekspresije Bcl-2 u tkivu mozga ($p < 0,05$), i time podstiče nastanak apoptoze. Naknadni
18 tretman vitaminom B1 je doveo do povećanja ekspresije u grupama od 1,50 mg/kg CPF+B1 i
19 3,00 mg/kg CPF+B1 ($p < 0,05$) ili je održavao na kontrolnom nivou (6,00 mg/kg CPF+B1).

20 Pri ispitivanju laktat dehidrogenaze dokazano je povećanje ($p < 0,05$) samo jedne
21 izoforme koja po pokretljivosti odgovara LDH₅ izoformi, koja nedvosmisleno ukazuje na
22 oštećenje hepatocita i curenja ovog enzima u plazmu. Relativna aktivnost LDH₅ je u direktnoj
23 vezi sa koncentracijom CPF-a. Primena vitamina B1 ima protektivno dejstvo na hepatocite i
24 sprečava izlazak ovog enzima u cirkulaciju ($p < 0,001$). Sam vitamin B1 ne izaziva povećanje
25 aktivnosti LDH₅.

26 U našem ispitivanju tretman sa CPF-om kao i kombinovano dejstvo CPF-a i vitamina
27 B1 dovode do pada koncentracije albumina ($p < 0,05$). Smanjenje koncentracije frakcije α 1-
28 globulina usled dejstva CPF-a je bez statističke značajnosti, dok je naknadni tretman sa
29 vitaminom B1 doveo do značajnog porasta ($p < 0,001$) ove frakcije. Tretman sa CPF-om kao i
30 kombinovano dejstvo CPF-a i tiamina dovelo je do povećanja frakcija α 2- i statistički
31 značajnog povećanja β -globulina samo u prisustvu najviše doze CPF-a ($p < 0,05$).
32 Globulinska frakcija se takođe statistički značajano povećala samo u prisustvu najveće doze
33 CPF-a ($p < 0,05$), a kombinovani tretman CPF i B1 je doveo do smanjenja koncentracije γ -
34 globulina ($p < 0,001$).

35 Usled dejstva CPF-a povećana je koncentracija ukupnog holesterola, koja se
36 smanjuje nakon tretmana vitaminom B1, bez statističke značajnosti. CPF je izazvao porast
37 ApoB ($p < 0,001$) i smanjenje ApoA frakcije ($p < 0,05$). Pozitivan efekat vitamina B1 na lipidni
38 status prepelica se mogao uočiti usled povećanja ApoA ($p < 0,0001$) i smanjenja ApoB frakcije
39 ($p < 0,05$).

40 Ispitujući uticaj CPF-a na ARE kod prepelica dokazali smo porast aktivnosti u plazmi i
41 jetri ($p < 0,001$) sa porastom doze CPF izuzev najveće doze u jetri. U mozgu je dokazano
42 povećanje aktivnosti sa 1,50 mg/kg ($p < 0,0001$) dok ostale dve doze dovode do smanjenja
43 aktivnosti bez statističke značajnosti. Tretman vitaminom B1 je doveo do značajnog
44 povećanja ARE u plazmi (pri dozama 1,50 mg/kg i 3,00 mg/kg), jetri (pri dozi od 6 mg/kg) i
45 mozgu ($p < 0,001$).

46 U našem ispitivanju dokazano je da CPF u plazmi i mozgu kod prepelica podstiče rad
47 imunog sistema i dolazi do pojačanog oslobađanja proinflamatornih citokina IL-1 ($p < 0,01$) i
48 IL-6 ($p < 0,001$). Tretman vitaminom B1 je doveo do smanjenja prisutnih citokina u odnosu na
49 grupu koja je bila tretirana samo sa CPF-om, ali je ipak primećena reakcija organizma u
50 odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

51 Ispitivanjem sposobnosti hvatanja radikala DPPH testom, pokazano je da efikasnost
52 vitamina B1 zavisi od primenjene koncentracije. Procenat inhibicije od 50% je dobijen u
53 DPPH testu sa koncentracijom vitamina B1 od $18 \pm 0,2$ mg/mL. Dobijene vrednosti za
54 efikasnu koncentraciju (50% inhibicije) ukazuju na dobru antioksidativnu sposobnost ovog
55 vitamina. Redukciona sposobnost vitamina B1 je iznosila $1,6 \pm 0,02$ mg/mL, što je znatno
56 veće u odnosu na redukcionu sposobnost BHT-a kao standarda, sa izrazito velikim
57 redukcionim potencijalom, od $4,0$ mg/mL $\pm 0,4$.

58 Na osnovu rezultata osmotske fragilnosti eritrocita uočava se da CPF indukuje
59 hemolizu eritrocita u svim dozama. Kod grupe koja je tretirana CPF-om u dozi od 1,50 mg/kg
60 H₅₀ iznosio je $0,4506 \pm 0,018$, u dozi od 3,00 mg/kg H₅₀ iznosio je $0,4728 \pm 0,011$, od 6,00

1 mg/kg H₅₀ iznosio je 0,5013±0,031. Vitamin B1 značajno povećava stabilnost njihove
2 membrane i smanjuje stepen hemolize do 9,16% u najvećoj dozi CPF-a. U grupi tretiranoj
3 samo vitaminom B1 H₅₀ je najniži u odnosu na sve ispitivane grupe i iznosio je 0,3879±0,024.
4

5 U poglavlju **Diskusija**, kandidat poredeći rezultate svojih ispitivanja sa navodima iz
6 literature, konstatuje da tiamin ima antioksidativna svojstva, jer smanjuje stepen lipidne
7 peroksidacije, čiji nivo raste posle dejstva CPF-a. Pored direktnog, vitamin B1 ima i indirektno
8 antioksidativno dejstvo, menjajući aktivnost antioksidativnih enzima SOD i CAT, kao i
9 aktivnost ARE u mozgu i GST, dok povećava ukupnu koncentraciju GSH u mozgu (glavnog
10 neenzimskog antioksidansa). Vitamin B1 efikasno dovodi do oporavka aktivnosti BuChE u
11 plazmi, jetri i mozgu koja je značajno inhibirana dejstvom CPF-a, dok je efekat poboljšanja
12 aktivnosti AChE najbolje izražen u mozgu. Takođe, tiamin ostvaruje i antiinflamatorno dejstvo
13 smanjenjem produkcije proinflamatornih medijatora IL-1 i IL-6, smanjenjem NO₂⁻ u plazmi i
14 mozgu, snižavajući ekspresiju iNOS u mozgu i COX-2 u tkivu jetre i mozga, smanjuje
15 aktivnost MPO u jetri i mozgu. Ispitivanjem signalnih mehanizama zaključeno je da tiamin ove
16 efekte ostvaruje smanjujući aktivaciju ERK signalne kaskade u jetri.

17 Treba istaći da je većina rezultata prikazanih u ovoj disertaciji u skladu sa literaturnim
18 podacima koji su dobijeni na drugim vrstama i tkivima, dok je podataka o dejstvu CPF-a na
19 prepelice veoma malo, ili ih za većinu praćenih parametara uopšte nema. Takođe, u
20 dosadašnjoj literaturi nema podataka o delovanju B1 vitamina nakon trovanja CPF-om kod
21 ptica. Stoga su rezultati ove disertacije u tom smislu jedinstveni i predstavljaju originalni
22 doprinos sveukupnom razumevanju mehanizama dejstva CPF-a, kao i organofosfatnih
23 jedinjenja uopšte, ali i o protektivnom delovanju B1 vitamina.

24 U spisku **literature** kandidat pravilno navodi i u tekstu citira, 441 dobro odabranih referenci.
25

26 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 27 disertaciji): 28

29 U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i na osnovu analize dobijenih
30 rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- 31 1. Subakutna primena tri subletalne doze CPF-a (1,50; 3,00 i 6,00 mg/kg t.m.) kod japanskih
32 prepelica dovodi do promene oksido-redukcionih parametara u plazmi, tkivu jetre i
33 mozga. Tretman CPF-om, u sve tri korišćene doze utiče na indikatore oksidativnog stresa
34 tako što menja aktivnost enzima SOD1, SOD2, CAT, GST i koncentraciju GSH i NO₂⁻.
- 35 2. Statistički značajna povećanja vrednosti parametara oksidativnog stresa dovode do
36 promene osmotske fragilnosti ćelija, oštećenja lipida, hepatocelularnog oštećenja i
37 potvrđuju ulogu oksidativnog stresa kod izloženosti CPF-u.
- 38 3. Vitamin B1 (10 mg/kg t.m.) aplikovan 30 minuta nakon tretmana CPF-om pokazuje
39 antioksidativna svojstva direktno preko enzima antioksidativne odbrane (SOD1, SOD2,
40 CAT, GST) i očuvanjem redoks potencijala. Vitamin B1 primenjen pojedinačno ili nakon
41 CPF-a, povećava ukupnu koncentraciju redukovano glutationa u mozgu. Primena B1
42 vitamina nakon CPF-a smanjuje stepen lipidne peroksidacije u plazmi, tkivu jetre i mozga.
- 43 4. Upotreba AChE kao indikatora stepena oštećenja izazvanih primenom CPF-a je
44 potvrđena, a posebno njena uloga u mozgu kao indikatora neuroloških efekata CPF-a.
45 Stepen inhibicije AChE u mozgu prati stepen inhibicije u eritrocitima, dok je najveća
46 inhibicija zabeležena u jetri i do 64,18%.
- 47 5. Protektivna uloga vitamina B1 ogleda se u povećanoj aktivnosti AChE nakon inhibitornog
48 dejstva CPF-a pri čemu se najizraženiji efekat zapaža u mozgu. Sam vitamin B1 takođe
49 povećava aktivnost AChE u tkivu jetre i mozga sa najvećim efektom u mozgu, gde je ovo
50 povećanje i do 17,48 puta u odnosu na kontrolnu grupu.
- 51 6. CPF inhibira BuChE u plazmi, tkivu jetre i mozga sa maksimalnim stepenom inhibicije u
52 plazmi (78,66%). BuChE u plazmi je u većoj meri inhibirana nego AChE u eritrocitima
53 nakon tretmana CPF-om i zbog toga se BuChE može koristiti kao biomarker izloženosti
54 dejstvu CPF-a.

- 1 7. Tretman vitaminom B1 je povećao aktivnost BuChE, nakon inhibicije CPF-om, na nivo
2 fiziološke aktivnosti u plazmi, tkivu jetre i mozga. Efekat tretmana samo B1 vitaminom je
3 tkivno specifičan, u plazmi smanjuje aktivnost ovog enzima, dok je u mozgu značajno (za
4 60%) povećava.
- 5 8. CPF utiče na sintezu proteina i menja njihovu zastupljenost. Tretman CPF-om dovodi do
6 pada koncentracije albumina i α 1- globulina, kao i do povećanja α 2- , β i γ -globulina.
7 Povećanje globulinske frakcije je najizraženije u prisustvu najveće doze CPF-a. CPF je
8 izazvao promenu u zastupljenosti lipoproteina - porast ApoB i smanjenje ApoA frakcije,
9 kao i povećanje aktivnosti arilesteraza.
- 10 9. Pozitivni efekat primene vitamina B1 nakon tretmana CPF-om na lipidni status u plazmi
11 prepelica ogleđa se u povećanju koncentracije Apo A i smanjenju koncentracije ApoB
12 frakcije. B1 vitamin sam po sebi, kao i u kombinaciji sa CPF-om povećava aktivnost
13 arilesteraza i njihovu protektivnu ulogu od oksidativnog stresa.
- 14 10. CPF uvodi ćeliju u apoptozu tako što povećava ekspresiju *inducibilne* azot-oksida sintaze
15 (iNOS) i c-Jun N- terminalne kinaze (JNK), ciklooksigenaze 2 (COX-2), kao i kinaze čija je
16 aktivnost regulisana ekstracelularnim signalima (ERK1,2), ali smanjuje nivo Bcl-2 u
17 mozgu.
- 18 11. Tretman vitaminom B1 redukuje produkciju proinflamatornog citokina, interleukina 6,
19 snižava i ekspresiju inducibilne azot oksida sintaze (iNOS), kao i ekspresiju
20 ciklooksigenaze-2 u jetri i mozgu. Ispitivanjem signalnih mehanizama zaključeno je da
21 tiamin ove efekte ostvaruje smanjujući aktivaciju ERK signalne kaskade u jetri.
- 22 12. CPF značajno povećava produkciju proinflamatornih citokina IL-1 i IL-6 u plazmi i mozgu.
23 Vitamin B1 ispoljava antiinflamatorno delovanje jer smanjuje produkciju ovih citokina pri
24 svim dozama CPF-a. Tretman vitaminom B1 smanjuje CPF-om izazvano povećanje
25 aktivnosti mijeloperoksidaza u jetri i mozgu i smanjuje oslobađanje nitrita u plazmi i
26 mozgu.
- 27 13. Vodeni rastvor vitamina B1 je ispoljio značajne antioksidativne sposobnosti u svim
28 ispitivanim koncentracijama (0,06-30,00 mg/mL), i izrazitu moć redukcije od 1,6 mg/mL,
29 ukazujući na njegov dobar antioksidativni kapacitet.

30

31 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
32 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
33 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

34

35 Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru doktorske disertacije kandidata Dejana
36 Čupić Miladinović su u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, a zaključci su
37 pravilno izvedeni i proizilaze iz dobijenih rezultata.

38

39 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

40

41 1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?

42

DA

43

44 2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?

45

DA

46

47 3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?

48

49 Sumiranjem ključnih nalaza ove studije može se istaći da su najznačajniji ishodi
50 kombinovane primene CPF-a i vitamina B1, snižavanje stepena ćelijskog oštećenja
51 nastalog pod dejstvom slobodnih radikala i efikasna redukcija inflamacije. Ova disertacija
52 predstavlja svestranu i detaljnu analizu procesa na ćelijskom i molekularnom nivou, što do
53 sada nije pokazano u literaturi i samim tim predstavlja veliki doprinos sveukupnom
54 razumevanju mehanizama dejstva CPF-a, kao i uočavanju specifičnosti koje su
55 karakteristične za njegovo dejstvo na ptice/prepelice. Na taj način se omogućava da se
56 nađu potencijalna ciljna mesta delovanja, da bi se ublažila štetna dejstva CPF-a. Pored
57 toga, značajno je istaći da je u ovoj disertaciji prvi put ispitivano moguće protektivno

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31
32

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Andreja Prevendar Crnić, redovni profesor- mentor 2
Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu

Dr Saša Ivanović, docent
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Sanja Dacić, docent
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Sanja Peković, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"
Univerziteta u Beogradu