

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.03.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Милене Влаховић и др Сенише Ђурашевића о урађеној докторској дисертацији **Драгане Р. Матић**, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања „Сениша Станковић“, Универзитета у Београду, под насловом „**Потенцијална улога губара (*Lymantria dispar*, L.) као биоиндикатора загађености животне средине: утицај хроничног излагања кадмијуму на развиће, активности дигестивних ензима средњег црева, механизме детоксификације и степен оштећења ДНК**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Милене Влаховић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Сениша Станковић“, др Сениша Ђурашевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, др Весна Перић Матаруга, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Сениша Станковић“, др Лариса Илијин, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Сениша Станковић“ и др Стоимир Коларевић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Драгане Р. Матић** под насловом „**Потенцијална улога губара (*Lymantria dispar*, L.) као биоиндикатора загађености животне средине: утицај хроничног излагања кадмијуму на развиће, активности дигестивних ензима средњег црева, механизме детоксификације и степен оштећења ДНК**“, написана је на 135 страна, садржи 36 слика и 10 табела и у њој је цитирано 345 научних публикација. Докторску дисертацију чине: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима и Прилози. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (20 страна), **Циљеви рада** (1 страна), **Материјал и методе** (17 страна), **Резултати** (38 страна), **Дискусија** (28 страна), **Закључци** (4 стране) и **Литература** (27 страна). У оквиру Прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** докторске дисертације кандидаткиња Драгана Р. Матић истакла је важност проблематике праћења нивоа загађености животне средине кадмијумом с обзиром на његову доказану токсичност по живи свет, укључујући и човека. Позивајући

се на релевантне литературне изворе, указала је на главне узроке глобалног повећања концентрације кадмијума и изложила опште механизме његове токсичности. Дала је преглед актуелних сазнања о одабраним параметрима различитих нивоа биолошке организације са нагласком на њихове одговоре на деловање кадмијума и аспектима њихове примене у мониторингу загађености. Евидентно је настојање кандидаткиње да, кад год је могуће, наводи литературне податке који се односе на инсекте или друге таксоне зглавкара. Образложен је значај дигестивних ензима (протеаза, алкалних и киселих фосфатаза и неспецифичних естераза) у екотоксикологији и детаљно су размотрени посредни и непосредни ефекти кадмијума на њихову активност. Значајан простор посвећен је хелијским детоксификационим механизмима (антиоксидативна одбрана, Hsp70 и металотионеин) у светлу њихових улога у одговору на деловање кадмијума. Изложене су информације о акумулацији кадмијума у различитим деловима организма и фецесу инсеката у контексту његове секвестрације и елиминације. Осим о механизмима генотоксичности кадмијума, Драгана Р. Матић изнела је податке о успешној примени комет теста у екотоксиколошким студијама на бескичмењацима укључујући инсекте. У наставку, изнела је бројне релевантне резултате досадашњих студија о штетним ефектима кадмијума на нивоу особина фитнеса инсеката (преживљавање, фекундитет, фертилитет, масе ларви, трајање развића). Кандидаткиња је на крају дала дефиниције биомаркера загађености загађујућим материјама наглашавајући предности биомаркера који припадају нижим нивоима биолошке организације (молекуларних, биохемијских, хелијских) у односу на оне на нивоу целог организма. Посебно је истакнут феномен, забележен код бројних врста бескичмењака, да дуга изложеност популације загађујућим материјама може да резултира њеном повећаном толеранцијом на метале, због чега се део истраживања односио на испитивање ефекта порекла популације губара на потенцијалне биомаркере загађења.

У поглављу **Циљеви** Драгана Р. Матић навела је опште и специфичне циљеве ове докторске дисертације. Основни циљ односи се на процену врсте *Lymantria dispar* (Lepidoptera) као биоиндикатора загађења кадмијумом. Одабрани су параметри који припадају различитим нивоима биолошке организације чије је одговоре након хроничне изложености ларви деловању кадмијума требало испитати у зависности од концентрације метала и порекла популације. Наведени су следећи ужи циљеви дисертације: одређивање специфичних активности и анализа изоформи дигестивних ензима (трипсина, леуцин аминоксидазе, укупних протеаза, алкалних фосфатаза, укупних, нелизозомских и лизозомских киселих фосфатаза и неспецифичних естераза) и антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе и каталазе) у средњем цреву ларви, испитивање промена експресије Hsp70 у средњем цреву и мозгу, одређивање концентрације металотионеина у средњем цреву, испитивање акумулације кадмијума у средњем цреву, глави, интегументу и измету, утврђивање нивоа оштећења ДНК у хемокитима и њихове вијабилности, као и одређивање ефеката кадмијума на особине фитнеса (укупни број јаја у леглима и удео неоплођених јаја, преживљавање, масу ларви и релативну брзину раста IV и V ларвеног ступња и параметре трајања развића).

Поглавље **Материјал и методе** садржи детаљне информације о пореклу животиња коришћених у експериментима, третманима кадмијумом, као и о примењеним експерименталним техникама. Губарска легла сакупљена су на две загађене локације (Космај и Хомолске планине) и две загађене (уз Ибарску магистралу и код рудника у Бору). У оквиру сваке популације формиране су по три експерименталне групе: контролна и хронично третиране са 50 и 100 µg Cd/g суве хране. Третман је трајао од излегања ларви до жртвовања трећег дана IV ступња за Експеримент I, изведен на популацијама са

Космаја и локалитета код Ибарске магистрале, односно, до трећег дана V ступња за Експеримент II, на популацијама са Хомољских планина и из Бора. Следећи параметри фитнеса праћени су код све четири популације: преживљавање ларви, маса ларви, релативна брзина раста, трајање појединачних ступњева развића и укупно трајање развића до жртвовања. Маса ларви мерена је првог, другог и трећег дана последњег ларвеног ступња пред жртвовање. Релативна брзина раста израчуната је на основу вредности масе ларви првог и трећег дана. За Експеримент I у леглима је утврђен укупан број јаја и проценат неоплођених јаја. Специфичне активности дигестивних ензима (трипсина, леуцин аминокиселиназе, укупних протеаза, алкалних фосфатаза, лизозомских и нелизозомских киселих фосфатаза и неспецифичних естераза) и антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе и каталазе) у средњем цреву одређене су спектрофотометријски, а њихове изоформе одређене су техником зимограма. За утврђивање нивоа Hsp70 у средњем цреву примењен је Western blot, а у узорцима мозга Western blot и ELISA тест. Концентрација металотионеина у средњем цреву одређена је електрофоретски применом кита (MT PAGE Tissue (Ikzus Environment)) који је садржао стандард металотионеина. Концентрација кадмијума одређена је у узорцима средњег црева, главе, интегумента и фецеса применом оптичке емисионе спектрометрије са индуктивно спрегнутом плазмом (ICP-OES). У оквиру Експеримента II утврђена је вијабилност хемоглобина помоћу диференцијалног акридин оранж/етијидијум бромид есеја и ниво оштећења ДНК применом алкалног комет теста. Интегрисани одговор биомаркера чинили су следећи параметри: вијабилност хемоглобина, ниво оштећења ДНК, маса ларви трећег дана петог ступња и укупно трајање развића ларви од излегања до жртвовања трећег дана петог ступња. Квантитативна анализа електрофоретских трака урађена је употребом софтвера ImageJ (National Institutes of Health, USA). За статистичку обраду резултата примењен је софтвер GraphPad Prism v.5.00, демо верзија NCSS и статистички пакет PLS Tool Box, v.6.2.1 за MATLAB 7.12.0 (R2011a).

У поглављу **Резултати** сви експериментални подаци су логично и јасно представљени графички и табеларно. У првом одељку приказани су ефекти кадмијума на дигестивне ензиме средњег црева ларви из популација са Космаја и уз Ибарску магистралу. Када су у питању трипсин, леуцин аминокиселиназа, неспецифичне естеразе, укупне киселе и нелизозомске фосфатазе, обе концентрације кадмијума довеле су до промена специфичних активности ових ензима код космајских ларви, док су код ларви са контаминираних локација промене регистроване само код укупних киселих и нелизозомских фосфатаза, и то након третмана вишом концентрацијом метала. Укупне протеазе ларви из обе популације биле су осетљиве само на вишу концентрацију кадмијума. Код ларви са обе локације уочен је усаглашен одговор антиоксидативних ензима, супероксид дисмутазе и каталазе, у присуству кадмијума – код космајских ларви смањење њихових специфичних активности након излагања вишој концентрацији метала, а код ибарских ларви смањење после излагања обема концентрацијама. Утврђено је да кадмијум у већој мери индукује експресију Hsp70 у цреву ларви из загађене шуме у односу на ларве уз магистрални пут. Ипак, у мозгу је након третмана ниво експресије Hsp70 био снижен у свим експерименталним групама у односу на одговарајућу контролу, осим код ларви са Космаја храњених са 50 µg Cd/g суве хране. Значајан раст концентрације металотионеина установљен је само код популације уз Ибарску магистралу након оба третмана. Анализа садржаја кадмијума у органима и фецесу показала је да се код контролних група гусеница обе популације метал акумулира у глави, док је највећа његова концентрација код третираних ларви детектована у фецесу. Након третмана са 50 µg Cd/g суве хране значајно виша концентрација кадмијума забележена је у фецесу, а значајно нижа у главама ларви са загађене локације у односу на ларве са загађене

локације. У леглима губара прикупљених уз Ибарску магистралу број јаја био је значајно мањи, а удео неоплођених јаја већи, у односу на легла са Космаја. Код обе популације само је излагање вишој концентрацији кадмијума довело до смањења масе ларви и релативне брзине раста. У популацији са Космаја други ларвени ступањ био је продужен након третмана са 50 µg Cd/g суве хране, а трећи након третмана са 100 µg Cd/g суве хране у односу на контролу. У Експерименту II, кандидаткиња је код популације са Хомољских планина уочила да излагање кадмијуму резултира повећањем нивоа ДНК оштећења и дозно-зависним падом вијабилности хемоцита, док је код ларви из Бора виша концентрација метала узроковала смањење вијабилности, а генотоксични ефекат је изостао. Анализа особина фитнеса показала је дозно-зависно снижење масе третираних ларви петог ступња са неконтаминираниог локалитета и смањење њихове релативне брзине раста само након излагања концентрацији од 100 µg Cd/g суве хране. За ту популацију карактеристично је и продужено трајање старијих ступњева развића и укупног развића. У популацији из Бора кадмијум није довео до промена масе ларви нити релативне брзине раста, већ само до промена у трајању првог и другог ларвеног ступња.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња је показала да је добро упућена у актуелну литературу из области екофизиологије те је са успехом интерпретирала експерименталне резултате из своје дисертације у контексту до сада публикованих студија. Одговори параметара на различитим нивоима биолошке организације ларви губара (молекуларном, биохемијском, ћелијском и на нивоу целог организма) анализирани су у контексту зависности од концентрације кадмијума којој су организми били изложени и порекла популације (са неконтаминираних или контаминираних локација). Добро познавање фундаменталних биолошких феномена омогућило је кандидаткињи да уочи логичну повезаност установљених промена. Осетљивост дигестивних ензима на кадмијум, акумулација метала у ткивима и његова елиминација, стратегије детоксификације и промене на нивоу особина фитнеса ларви из различитих популација изложених кадмијуму сагледани су кроз призму адаптација (физиолошких или генетичких) са посебним освртом на енергетску цену адаптација коју плаћа ћелија, односно организам.

У **Закључцима** је Драгана Р. Матић резимирала резултате из своје дисертације који генерално показују да су популације губара са загађених локација (Космај и Хомољске планине) осетљивије на кадмијум у односу на популације које су генерацијама биле изложене токсикантима (локације уз Ибарску магистралу и код рудника у Бору). Доминантни одбрамбени механизам ларви са Космаја у одговору на кадмијум била је индукција синтезе Hsp70, док се синтеза металотионеина показала значајнијом код ларви уз Ибарску магистралу. Након третмана, код обе популације је највиши ниво кадмијума регистрован у фецесу, али је након примењене ниже концентрације овог метала његова елиминација била значајно интензивнија код ларви са загађеног локалитета, што указује на ефикаснију детоксификацију. Кандидаткиња је констатовала да су штетни ефекти метала и енергетски скупи детоксификациони механизми довели до промена и на нивоу особина фитнеса код свих популација иако не у истој мери. Примена већине испитаних параметара (специфичне активности трипсина, нелизозомских киселих фосфатаза и неспецифичних естераза, нивоа експресије Hsp70, вијабилности хемоцита и нивоа оштећења ДНК) као биомаркера загађења кадмијумом, а који су показали довољну осетљивост на овај метал, ограничена је на популације које претходно нису биле изложене загађујућим материјама. Концентрација металотионеина могла би бити ваљан показатељ контаминације у популацијама са историјом изложености токсикантима. Кандидаткиња је истакла да су параметри на нижим нивоима биолошке организације (молекуларном, биохемијском и ћелијском) генерално показали већу осетљивост на кадмијум у односу на

цео организам, осим код Хомољске популације. Најважнији закључак Драгане Р. Матић односи се на препоруку да врста *Lymantria dispar* (Lepidoptera) показује значајан потенцијал као биоиндикатор загађености животне средине кадмијумом, али уз ограничење на популације које претходно нису биле изложене загађујућим материјама у дужем временском периоду.

У поглављу **Литература** кандидаткиња је навела 345 библиографских јединица, што показује да је веома студиозно приступила изучавању проблематике којом се бави докторска дисертација.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21a Mатић D.**, Vlahović M., Kolarević S., Perić Mataruga V., Ilijin L., Mrdaković M., Vuković Gačić B. (2016) Genotoxic effects of cadmium and influence on fitness components of *Lymantria dispar* caterpillars. *Environmental Pollution*, 218, 1270–1277. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.085> **IF 5.099**
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116310697?via%3Dihub>
2. **M21a Vlahović M., Mатић D., Mutić J., Trifković J., Đurđić S., Perić Mataruga V.** (2017) Influence of dietary cadmium exposure on fitness traits and its accumulation (with an overview on trace elements) in *Lymantria dispar* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 200, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.06.003> **IF 2.416**
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045617301205?via%3Dihub>

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M**
2. **M**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију Драгане Р. Матић, Комисија констатује да приказани резултати дају важан научни допринос разумевању хроничне токсичности кадмијума, његовог утицаја на активност дигестивних, детоксификационих и ензима антиоксидативне одбране, као и промене особина фитнеса код ларви губара *Lymantria dispar* L. Посебно задовољство нам представља чињеница да је први пут код губара детектован металотионеин, одређен степен генотоксичности кадмијума, вијабилност хемоглобина и измерена концентрација кадмијума и других метала у цреву, интегументу, глави и фецесу. Докторска дисертација Кандидата даје увид у физиолошки одговор популација губара, пореклом са различитих локалитета, у светлу примене ове врсте као потенцијалног биоиндикатора у екотоксиколошким истраживањима и коришћења најосетљивијих физиолошких биомаркера.

Докторска дисертација је урађена у складу са циљевима наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе. Кандидаткиња Драгана Р. Матић је показала добро познавање актуелне научне области и релевантне литературе, висок степен истраживачке зрелости, самосталност у раду и решавању проблема, као и висок степен обучености у коришћењу савремених експерименталних метода. Драгана Р. Матић је до сада публиковала два рада у часописима категорије M21a, у којима су представљени резултати докторске дисертације.

На основу свега изложеног, као и квалитета радова које је кандидат објавио, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Потенцијална улога губара (*Lymantria dispar*, L.) као биоиндикатора загађености животне средине: утицај хроничног излагања кадмијуму на развиће, активности дигестивних ензима средњег црева, механизме детоксификације и степен оштећења ДНК“.

КОМИСИЈА:

др Милена Влаховић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Синиша Ђурашевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Весна Перић Матаруга, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Лариса Илијин, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Стоимир Коларевић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Биолошки факултет