

## ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију</p> <p><b>На 40. седници Већа ПМФ-а од 26.02.2018., на основу Одлуке Наставно научног већа ПМФ-а у Новом Саду, именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације.</b></p> <p>2. Састав комисије са знаком 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:</p> <p><b>Др Милица Матавуљ</b>, редовни професор у пензији, ужа научна област: Хистологија са ембриологијом, датум избора у звање: 29.02.2000., професор у пензији, ПМФ Универзитета у Новом Саду – председник,</p> <p><b>Др Јелена Марковић</b>, доцент, ужа научна област: Хистологија са ембриологијом, датум избора у звање: 10.02.2014., ПМФ Универзитета у Новом Саду – ментор,</p> <p><b>Др Данијела Којић</b>, ванредни професор, ужа научна област: Биохемија, датум избора у звање: 1.07.2015., ПМФ Универзитета у Новом Саду – члан,</p> <p><b>Др Верица Милошевић</b>, научни саветник, ужа научна област: Хистологија, датум избора у звање: 03.07.2002., Институт за биолошка истраживања ”Синиша Станковић” Универзитета у Београду – члан,</p> <p><b>Др Гордана Ушћебрка</b>, редовни професор, ужа научна област: Анатомија, хистологија и физиологија животиња, датум избора у звање: 16.06.2006., Пољопривредни факултет Универзитета у Новом Саду – члан,</p> <p><b>Др Мирјана Војиновић Милорадов</b>, професор емеритус, ужа научна област: Инжењерство заштите животне средине, датум избора у звање: 24.01.2008., ФТН Универзитета у Новом Саду – члан.</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p><b>Милена (Драган) Стошић</b></p> <p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p><b>9.12.1979. Нови Сад, Србија</b></p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p>

Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију, Универзитет у Новом Саду, Мастер академске студије биологије, мастер биолог

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија

2016. година, Докторске академске студије: Доктор наука – еколошке науке

5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:

Нема

6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: **Нема**

### III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Утицај третмана акриламидом на ендокрини панкреас пацова

### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Докторска дисертација је написана на 125 страна. Садржи 7 поглавља, 3 табеле, 53 слике и 477 литературних навода. Дисертација садржи следећа поглавља:

1. **Увод** (39 страна) у коме је образложена проблематика докторске дисертације, са детаљним прегледом релевантних литературних података који се односе на панкреас, акриламид, оксидативни стрес и ћелијску смрт.
2. **Циљеви** (2 стране) су прецизно конципирани у складу са проблемом, разлозима и значајем исраживања.
3. **Материјал и методе** (24 стране) дају детаљни увид у методологију рада и експериментални протокол.
4. **Резултати** (28 страна) истраживања су презентовани кроз две основне целине: 4.1. *Утицај третмана акриламидом на ендокрини панкреас мужјака пацова соја Wistar, третираних у јувенилном периоду* и 4.2. *Утицај третмана акриламидом на Rin-5F ћелијску линију*.
5. **Дискусија** (16 страна) представља анализу и евалуацију резултата тезе и њихову компарацију са релевантним литературним подацима из области истраживања.
6. **Закључци** (2 стране) су јасно и прецизно изведени из резултата добијених у експерименталном делу тезе.
7. **Литература** (20 страна) садржи 477 литературних навода.

### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

#### Прво поглавље

Прво поглавље, Увод, се састоји из четири засебна сегмента: 1.1. *Панкреас*, 1.2. *Акриламид*, 1.3. *Оксидативни и нитрозативни стрес* и 1.4. *Ћелијска смрт*.

У Уводу је дат детаљан преглед литературе који пружа адекватан увид у досадашња истраживања из области проучавања докторске дисертације. Приказане су физичко-хемијске карактеристике акриламида, примена ове токсичне супстанце у свакодневном животу и њено присуство у животној средини, са посебним акцентом на присуство и настанак акриламида у намирницама. Детаљно је приказан метаболизам акриламида и улога коју има ензим P450 2E1 (CYP2E1) у детоксикацији акриламида у биолошким системима изложеним овој токсичној супстанци. Посебан акценат је стављен на негативне ефекте акриламида на различите ћелије и ткива како у *in vivo*, тако и у *in vitro* условима, који су до сада показани.

У Уводу је, такође, дат осврт на слободне кисеоничне и азотне врсте, на ензимске и неензимске механизме антиоксидативне заштите, као и на утицај акриламида на појаву оксидативног стреса.

Ћелијска смрт као могућа последица оксидативног стреса је, такође, описана у последњем сегменту Увода.

Комисија оцењује да је Увод комплексно и свеобухватно написан и обрађен. Имајући у виду досадашње, у великој мери неконзистентне резултате испитивања ефеката акриламида на ендокрини панкреас, Комисија сматра да је у овом поглављу јасно указано на оправданост и значај даљих истраживања у овој области.

#### **Друго поглавље**

У другом поглављу, Циљеви, су дефинисани циљеви ове дисертације који су у складу са пријавом теме и садржајем дисертације. Циљеви су подељени у две групе, како би се испитали ефекти акриламида на структуре ендокриног панкреаса у *in vivo* и у *in vitro* условима.

Прва група циљева се односила на *in vivo* испитивање ефеката пероралног третмана акриламидом у дозама од 25 mg по килограму телесне масе (mg/kg tm) и 50 mg/kg tm на ендокрини панкреас на анималном експерименталном моделу: мужјацима пацова соја Wistar који су третирани током јувенилног периода. Друга група циљева се односила на *in vitro* испитивања ефеката третмана акриламидом на ћелијску културу инсулинома бета ћелија пацова (Rin-5F, ATCC-CRL-2058).

Комисија оцењује да су циљеви ове дисертације јасно дефинисани, да су у складу са пријавом теме и садржајем дисертације.

#### **Треће поглавље**

У трећем поглављу, Материјал и методе, су прецизно описане све методе које су коришћене у реализацији постављених циљева. У првом сегменту овог поглавља (3.1.) је описан анимални модел пацова соја Wistar који је коришћен у експерименталном раду. Детаљно је описан план експеримента према коме су третиране животиње, као и експериментални протоколи који су праћени током узорковања и обраде узорака панкреаса и крви експерименталних животиња. Протокол обраде ткива панкреаса је у складу са стандардним процедурама за хистолошку анализу. Хистолошке, стереолошке и серолошке методе, методе за квантификацију експресије одабраних протеина, као и тестови за статистичку обраду података који су коришћени у експерименталном раду су адекватно одабрани и јасно описани.

У оцењује 3.2. овог поглавља описана је Rin-5F ћелијска линија инсулинома  $\beta$ -ћелија пацова која је коришћена у експерименталном раду. Методе за утврђивање вијабилности  $\beta$ -ћелија, активности антиоксидативних ензима, присуства биомаркера оксидативног стреса и концентрације нитрита у супернатанту ћелијске културе Rin-5F ћелија, као и методе за одређивање релативног нивоа експресије одабраних гена су прецизно и детаљно описане.

Комисија оцењује да су изабране методе за реализацију наведених циљева истраживања одговарајуће, поуздане и савремене, као и изабрани тестови за статистичку обраду добијених података.

#### **Четврто поглавље**

Четврто поглавље, Резултати, је, у складу са циљевима тезе, класификовано у две целине: 4.1. *Утицај третмана акриламидом на ендокрини панкреас мужјака пацова соја Wistar третираних у јувенилном периоду* и 4.2. *Утицај третмана акриламидом на Rin-5F ћелијску линију*. Резултати су систематично и јасно изложени и документовани помоћу графикона и микрографија и у складу су са текстуалним објашњењима сваког испитиваног квалитативног и квантитативног параметра ендокриног панкреаса контролних животиња и животиња третираних акриламидом.

Комисија оцењује да су резултати приказани на прегледан начин и да су јасни за тумачење.

#### **Пето поглавље**

У петом поглављу, Дискусија, је дато јасно објашњење добијених резултата истраживања које је стављено у контекст досадашњих релевантних литературних података из области. Одабрани литературни подаци са којима су резултати тезе поређени су адекватно одабрани, актуелни и у складу са проучаваном тематиком.

Комисија оцењује да је Дискусија научно и логично написана и да јасно указује на значај добијених резултата у светлу досадашњих сазнања у овој области.

### **Шесто поглавље**

Комисија оцењује да су Закључци докторске дисертације изведени на јасан, систематичан и концизан начин и да су у складу са постављеним циљевима истраживања и добијеним резултатима.

### **Седмо поглавље**

У седмом поглављу, Литература, је наведена комплетна листа коришћене литературе. Комисија оцењује да су литературни наводи адекватно одабрани, актуелни и у потпуности у складу са проблематиком дисертације. На основу одабраних референци Комисија закључује да кандидат показује добро познавање области и предмета истраживања дисертације.

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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

**Stošić M, Matavulj M, Marković J (2018) Effects of subchronic acrylamide treatment on the endocrine pancreas of juvenile male Wistar rats. Biotechnic & Histochemistry, DOI: 10.1080/10520295.2017.1393562 (M23)**

## **VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

У овој дисертацији је испитан утицај акриламида на ендокрини панкреас јувенилних мужјака лабораторијских пацова соја Wistar, од њиховог 23. до 42. постнаталног дана (*in vivo* експеримент), као и утицај третмана акриламидом на Rin-5F ћелијску линију инсулинома  $\beta$ -ћелија пацова (*in vitro* експеримент).

У *in vivo* експерименту у оквиру дисертације, две од три групе експерименталних животиња третиране су путем гаваже раствором акриламида у дозама од 25 mg/kg tm и 50 mg/kg tm, док је трећа група била контролна и примала је еквивалентну запремину дестиловане воде. На пресецима панкреаса, обојеним стандардним хистохемијским и имунохистохемијским методама извршена је њихова квалитативна (хистолошка) и квантитативна анализа. Квалитативна анализа је обухватала анализу структурних промена Лангерхансових острваца панкреаса и капиларне мреже код контролних животиња и животиња третираних акриламидом. Квантитативна анализа Лангерхансових острваца панкреаса контролних и акриламидом третираних животиња обухватила је одређивање броја и дијаметра Лангерхансових острваца и стереолошку анализу  $\alpha$ - и  $\beta$ -ћелија Лангерхансових острваца. На пресецима панкреаса обојеним имунохистохемијском методом уз коришћење одговарајућих антитела испитана је експресија глукагона и инсулина, као и експресија следећих ензима: индуцибилне азот-оксид синтетазе (iNOS), CYP2E1, каталазе (CAT), супероксид

дисмутазе 1 и 2 (SOD1 i SOD2). Истовремено, у серуму третираних и контролних пацова је одређен ниво глукозе.

У *in vitro* експерименту у оквиру дисертације, испитано је да ли третман са растућим концентрацијама акриламида (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM и 20 mM) утиче на вијабилност Rin-5F ћелијске линије инсулинома  $\beta$ -ћелија пацова. Испитан је утицај третмана акриламидом у концентрацији од 10 mM ( $IC_{50}$ ) током растућих временских интервала (0,5, 1, 3, 6, 12, и 24 h) на активност антиоксидативних ензима CAT и SOD, као и на параметре оксидативног стреса (концентрацију  $NO_2^-$ , ниво MDA, ниво GSH и слободних -SH група протеина) у Rin-5F ћелијама. Поред тога, испитана је и експресија гена за Вах и Bcl-2, инсулин, CAT, SOD1, SOD2, iNOS и CYP2E1 у Rin-5F ћелијама након третмана са акриламидом у концентрацији од 10 mM.

На основу добијених резултата испитивања утицаја акриламида у дозама од 25 mg/kg tm и 50 mg/kg tm на ендокрини панкреас јувенилних мужјака лабораторијских пацова соја Wistar, кандидат је у складу са постављеним циљевима извео следеће закључке:

1. Субхронични перорални третман акриламидом није изазвао промене у хистолошкој грађи ендокриног панкреаса, и није утицао на број и дијаметар Лангерхансових острваца третираних пацова;
2. Стереолошка анализа  $\alpha$ - и  $\beta$ -ћелија Лангерхансових острваца третираних пацова је указала на значајно дозно-зависно смањење вредности нумеричке густине ( $Nv\beta$ ) и површинске густине ( $Sv\beta$ )  $\beta$ -ћелија, док вредности волуменске густине ( $Vv\beta$ ), волуменске густине нуклеуса ( $Vvn\beta$ ), волуменске густине цитоплазме ( $Vvc\beta$ ) и нуклеоцитоплазматског односа ( $N\beta/C\beta$ )  $\beta$ -ћелија нису значајно промењене. Третман нижом дозом акриламида статистички значајно повећава вредности нумеричке густине  $\alpha$ -ћелија ( $Nv\alpha$ ), док код животиња третираних вишом дозом вредност овог параметра се не разликује значајно у поређењу са контролом. Вредности волуменске густине ( $Vv\alpha$ ), површинске густине ( $Sv\alpha$ ), волуменске густине нуклеуса ( $Vvn\alpha$ ), волуменске густине цитоплазме ( $Vvc\alpha$ ) и и нуклеоцитоплазматског односа ( $N\alpha/C\alpha$ )  $\alpha$ -ћелија се не разликују значајно од вредности ових параметара код контролних животиња, без обзира на коришћену дозу;
3. Евалуацијом експресије инсулина, глукагона, iNOS, CAT, SOD1, SOD2 и CYP2E1 у Лангерхансовим острвцима уочено је значајно, дозно-зависно, смањење вредности оптичке густине ћелија имунопозитивних на инсулин и CYP2E1. Иста анализа је показала сигнификантно дозно-зависно повећавање вредности оптичке густине имунопозитивних ћелија на глукагон и iNOS, док вредност оптичке густине ћелија имунопозитивних на ензиме CAT, SOD1 и SOD2 није значајно промењена;
4. Ниво глукозе у серуму није значајно промењен код третираних пацова.

На основу резултата добијених након третмана Rin-5F ћелијске линије акриламидом, Кандидат је у складу са постављеним циљевима извео следеће закључке:

1. Акриламид смањује вијабилност Rin-5F ћелијске линије инсулинома  $\beta$ -ћелија у концентрацијски-зависном маниру;
2. Третман са 10 mM акриламидом током растућих временских интервала показује да акриламид у Rin-5F ћелијској линији значајно повећава ниво MDA након третмана у трајању од 1, 12 и 24 h, као и ниво  $NO_2^-$  у свим тачкама третмана (0,5, 1, 3, 6, 12, 24 h). Акриламид у концентрацији од 10 mM сигнификантно смањује ниво редукваног GSH након третмана од 1, 3, 6, 12 и 24 h, као и ниво слободних -SH група након третмана од 3 и 6 h. Исти третман значајно појачава активност CAT након третмана од 1 h, међутим, третман у трајању од 12 h значајно смањује активност овог ензима. Акриламидни третман сигнификантно смањује активност SOD након 1, 12 и 24 h, док третман од 6 h значајно појачава активност ензима SOD;
3. Акриламид у концентрацији од 10 mM током различитих временских интервала утиче на промене у релативној експресији гена за инсулин, iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Вах и Bcl-2. Поменути третман је сигнификантно повећао транскрипцију гена за:
  - a. iNOS и Вах у свим тачкама третмана (0,5, 1, 3, 6, 12, 24 h),

- б. SOD1 и SOD2 након третмана од 12 и 24 h,
- ц. CAT након третмана од 3 h,
- д. CYP2E1 након третмана од 0,5 и 1 h,
- е. Bcl-2 након третмана од 0,5, 1 и 3 h.

Третман 10 mM акриламидом је значајно смањио релативну експресију гена за CYP2E1 након третмана у трајању од 12 и 24 h, док, није значајно променио релативну експресију гена за инсулин.

Сумирањем добијених резултата, Кандидат је закључио да је акриламид токсична супстанца која показује јасан ефекат како на микроструктурне карактеристике ендокриног панкреаса на нивоу  $\alpha$ - и  $\beta$ -ћелија, тако и на експресију инсулина, глукагона, iNOS, CAT, SOD1, SOD2 и CYP2E1 у ћелијама Лангерхансових острваца панкреаса. Поред ефекта који је показан на анималном моделу, *in vitro* анализа третмана акриламидом је показала цитотоксични ефекат ове супстанце на Rin-5F ћелијску линију инсулинома  $\beta$ -ћелија. Кандидат је у дисертацији показао да акриламид помера редокс-статус Rin-5F ћелија у смеру оксидације, као и да изазива промене у транскрипцији гена за iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Вах и Bcl-2 у овим ћелијама.

Резултати добијени у тези указују да је ендокрини панкреас, недвосмислено, једно од циљних ткива деловања акриламида.

Комисија сматра да су закључци у потпуности одговорили на постављене циљеве дисертације.

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

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

Прегледом дисертације кандидата Милене Стошић, Комисија закључује да теза има јасну форму, да је систематична, прегледна и у складу са темом дисертације. Тумачење резултата је објективно, аргументовано бројним литературним подацима, а изведени закључци проистичу из добијених резултата истраживања.

Напомена: докторска дисертација је у библиотеци ПМФ-а прошла проверу плагијарности применом софтвера iThenticate, који је показао да "similarity index" износи 10% (према упутству произвођача све вредности испод 15% представљају оригиналан рад).

У складу са наведеним, Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања у оквиру дисертације.

#### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE 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**

Да, докторска дисертација је у целини написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

##### **2. Да ли дисертација садржи све битне елементе**

Да, дисертација својим насловом, садржајем, резултатима истраживања и начином тумачења резултата садржи све битне елементе који се захтевају у радовима овакве врсте.

##### **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци**

Докторска дисертација "Утицај третмана акриламидом на ендокрини панкреас пацова" по својој свеобухватности, добијеним резултатима и изнетим закључцима представља нов и оригиналан

допринос науци јер даје потпунији увид у комплексне биолошке ефекте акриламида на ендокрини панкреас, са посебним акцентом на ефекат који има овај токсични мономер на вијабилност и оксидо-редукциони статус  $\beta$ -ћелија панкреаса. Важан допринос дисертације је детаљан хистолошки приказ деловања акриламида на нивоу  $\alpha$ - и  $\beta$ -ћелија Лангерхансових острваца код третираних пацова. У дисертацији је по први пут показано да третман акриламидом негативно делује на број и површину  $\beta$ -ћелија панкреаса, као и на присуство инсулина у  $\beta$ -ћелијама Лангерхансових острваца третираних пацова. Посебан оригинални допринос дисертације је резултат да третман акриламидом доводи до значајног пораста у броју  $\alpha$ -ћелија код пацова третираних нижом дозом акриламида. Истовремено, у тези је по први пут показано да третман акриламидом изазива значајан дозно-зависан пораст у количини присутног глукагона у  $\alpha$ -ћелијама панкреаса.

Значајан допринос дисертације је и у томе што је показано да акриламид ремети оксидо-редукциони статус  $\beta$ -ћелија панкреаса и помера га у смеру оксидације. У тези је, такође, по први пут показано да третман акриламидом доводи до веома значајног пораста у нивоу присутних нитрита, што је у директној вези са нивоом активности ензима iNOS и указује на потенцијалну појаву нитрозативног стреса у  $\beta$ -ћелијама панкреаса. Поред тога, у дисертацији је по први пут показано да третман акриламидом доводи до значајних варијација у транскрипцији гена за iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Вах i Bcl-2 у  $\beta$ -ћелијама Лангерхансових острваца панкреаса.

Из наведеног Комисија закључује да резултати дисертације представљају значајан научни допринос у области њеног истраживања.

**4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања**

Дисертација нема недостатке.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже:

Да се докторска дисертација ”Утицај третмана акриламидом на ендокрини панкреас пацова” прихвати, а кандидату Милени Стошић одобри јавна одбрана.

**ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ**

У Новом Саду

28.02.2018.

др Милица Матавуљ, редовни професор у пензији, председник

др Верица Милошевић, научни саветник, члан

др Данијела Којић, ванредни професор, члан

др Гордана Ушћебрка, редовни професор, члан

др Мирјана Војиновић Милорадов, професор емеритус, члан

др Јелена Марковић, доцент, ментор