

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10. 09. 2021. године, на основу молбе ментора, др Марије Мрдаковић, научног саветника Универзитета у Београду, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -Институт од националног значаја за Републику Србију, и др Синише Ђурашевића, редовног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Александре З. Филиповић** (рођене Мркоња), истраживача сарадника Универзитета у Београду, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -Институт од националног значаја за Републику Србију, под насловом: „**Физиолошко прилагођавање ларви губара, *Lymantria dispar* L., и жутотрбе, *Euproctis chrysorrhoea* L., (Lepidoptera) на деловање флуорантена**“, у саставу: др Марија Мрдаковић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Институт од националног значаја за Републику Србију, др Синиша Ђурашевић, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет, др Весна Перић Матаруга, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -Институт од националног значаја за Републику Србију.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Александре З. Филиповић, под насловом „Физиолошко прилагођавање ларви губара, *Lymantria dispar* L., и жутотрбе, *Euproctis chrysorrhoea* L., (Lepidoptera) на деловање флуорантена“, написана је на 118 страна, садржи 1 табелу и 87 слика, и у њој је цитирано 415 научних публикација. Докторску дисертацију чине: Насловна страна на српском и на енглеском језику, Подаци о менторима и члановима Комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница,

Садржај, Текст дисертације по поглављима и Прилози. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (10 страна), Циљ (1 страна), Материјал и методе (13 страна), Резултати (51 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (3 стране) и Литература (26 страна). У оквиру Прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Увод докторске дисертације Александре З. Филиповић састоји се из неколико потпоглавља у којима су изнете научне информације које дају теоријски оквир теме дисертације и тумачења остварених резултата и њиховог значаја, као и дискусије. У оквиру прва два потпоглавља наведене су особине, извори и значај штетних ефеката органских загађивача, полицикличних ароматичних угљоводоника (енг. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* - PAH) за живи свет, са посебним освртом на основне карактеристике свеприсутног PAH флуорантена и начине његовог деловања, уз навођење литературних извора.

У трећем потпоглављу описане су реактивне кисеоничне врсте и њихово штетно деловање, карактеристике и улога ензима антиоксидативне заштите (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион редуктаза), и глутатиона као неензимске компоненте антиоксидативне заштите, ензима детоксификације (карбоксилестераза, глутатион С-трансфераза, ацетилхолинестераза), као и протеина топлотног стреса (Hsp70).

У четвртном потпоглављу описан је значај улоге дигестивних ензима (протеаза, липаза, алкалних и киселих фосфатаза) у процесу варења хране, као и у условима деловања ксенобиотика. Такође је истакнута улога хемолимфе и њеног састава, липида и трехалозе, и у обезбеђивању енергије потребне за индукцију заштитних механизма при деловању стресора. У петом потпоглављу „Особине животне историје“ кандидаткиња је навела литературне податке о ефектима различитих ксенобиотика на особине животне историје инсеката.

У наредном поглављу кандидаткиња наводи **Циљ** дисертације, стицање увида у обрасце физиолошких одговора ларви *Lymantria dispar* L., и *Euproctis chrysorrhoea* L., (Lepidoptera, Erebidae) на присуство средински релевантних концентрација флуорантена додатог храни, и расветљавање механизма одбране од његовог штетног деловања.

Испитивања активности ензима антиоксидативне заштите и активности детоксификационих ензима, активности дигестивних ензима, промена концентрација липида и трехалозе у хемолимфи, као и промена особина животне историје ларви, пружају могућност сагледавања физиолошких одговора који омогућавају прилагођавање ларви испитиваних врста стресним условима у окружењу. Циљ дисертације остварен је одређивањем активности антиоксидативних ензима у средњем цреву и хемолимфи ларви, одређивањем активности детоксификационих ензима у средњем цреву и мозгу ларви, као и детекцијом образаца експресије протеина топлотног стреса (Hsp70) у средњем цреву и мозгу ларви, одређивањем активности дигестивних ензима средњег црева ларви, детектовањем и анализом експресије изоформи ензима, одређивањем концентрација липида и трехалозе у хемолимфи ларви ових врста инсеката, као и утврђивањем промена њихових особина животне историје. Такође, утврђене су разлике и сличности одговора испитиваних параметара између две врсте, на присуство различитих концентрација флуорантена у храни.

У поглављу **Материјал и Методе** кандидаткиња описује биологију врста *L. dispar* L., и *E. chrysorrhoea* L., порекло ларви коришћених у експериментима, експерименталне третмане и примењене методе. Дат је опис формирања експерименталних група, контролних и група ларви хронично излаганих флуорантену у вештачкој хранљивој дијети у концентрацијама од 6,7 и 67 ng /g суве хране. Ларве *L. dispar* од пиљења из јајних легла, а ларве *E. chrysorrhoea* од појаве из зимских гнезда, гајене су у контролисаним лабораторијским условима и храњене вештачком хранљивом дијетом са флуорантеном, до трећег дана по уласку у пети ларвени ступањ, када су жртвоване. Праћене су особине животне историје: трајање развића, масе ларви, као и релативне брзине раста ларви. Трећег дана по уласку у пети ступањ ларве су жртвоване, а поступци изоловања одговарајућих ткива и органа, као и методе припреме њихових хомогената детаљно су описани. Код ларви обе врсте праћене су активности антиоксидативних, детоксификационих, и дигестивних ензима. Активности ензима одређиване су одговарајућим спектрофотометријским методама. Изоформе ензима су детектоване техником зимограма, а квантитативна анализа електрофоретских трака урађена је употребом софтвера ImageJ (National Institutes of Health, USA). Концентрација липида и трехалозе у хемолимфи одређена је спектрофотометријски. Експресија протеина Hsp70 у

средњем цреву ларви утврђена је Western blot методом, а у узорцима мозга Western blot методом и ELISA тестом. Резултати су анализирани одговарајућим статистичким методама, док су канонијском дискриминационом и кластер анализом процењене разлике између врста у погледу одговора испитиваних параметара на присуство загађивача у храни.

У оквиру поглавља **Резултати**, кроз 7 потпоглавља, добијени резултати су представљени текстуално, праћени сликама и резултатима одговарајућих статистичких анализа. У првом потпоглављу приказани су ефекти флуорантена на параметре антиоксидативне заштите и детоксификације у целом средњем цреву и ткиву средњег црева ларви обе врсте. Значајно већа активност супероксид дисмутазе у целом средњем цреву и ткиву средњег црева ларви *L. dispar*, као и у ткиву средњег црева ларви *E. chrysorrhoea*, детектована је у одговору на хронично деловање флуорантена, додатог вештачкој хранљивој дијети. Активност каталазе је била повећана у ткиву средњег црева ларви *L. dispar*, у ткиву средњег црева и целом средњем цреву ларви *E. chrysorrhoea*. Значајно смањење активности глутатион редуктазе је забележено само у целом средњем цреву ларви *L. dispar*, излаганих деловању мање концентрације флуорантена. Концентрација глутатиона је била повећана у ткиву средњег црева ларви *E. chrysorrhoea* које су биле излагане деловању флуорантена. Описане су промене активности и експресије изоформи карбоксилестераза, као и повећање активности глутатион С-трансферазе и карбоксилестераза у ткиву средњег црева ларви *E. chrysorrhoea* које су биле под утицајем флуорантена. На крају овог потпоглавља показане су разлике између врста у одговору параметара антиоксидативне заштите на присуство различитих концентрација флуорантена, помоћу канонијске дискриминационе и кластер анализе.

У другој целини су приказани ефекти флуорантена на ензиме антиоксидативне заштите, супероксид дисмутазу и каталазу, у хемолимфи ларви. Значајно је смањена активност супероксид дисмутазе у хемолимфи ларви *L. dispar*, а забележен је супротан тренд активности каталазе у хемолимфи ларви, између врста, које су биле изложене деловању флуорантена.

У трећој целини кандидаткиња је описала ефекте флуорантена на параметре детоксификационог система у мозгу ларви. Ацетилхолинестеразе нису показале

осетљивост на флуорантен код ларви обе врсте, међутим овај загађивач је имао утицаја на карбоксилестеразе у мозгу ларви *L. dispar*, где је уочена редукција активности ензима.

У четвртом потпоглављу, кандидаткиња је приказала резултате експресије протеина топлотног стреса Hsp70 у целом средњем цреву и мозгу ларви обе врсте, у условима хроничног деловања флуорантена. Уочено је смањење експресије Hsp70 у цреву третираних ларви *E. chrysorrhoea*, као и цреву ларви *L. dispar* излаганих мањој концентрацији флуорантена. Експресија Hsp70 у мозгу ларви *L. dispar* је била повећана након третмана мањом концентрацијом флуорантена, док је код ларви *E. chrysorrhoea* забележено смањење експресије овог протеина у обе групе третиране флуорантеном.

У петом потпоглављу анализиран је утицај флуорантена на промене специфичних активности дигестивних ензима средњег црева ларви, као и на обрасце експресије њихових изоформи. Изложеност флуорантену довела је до значајног смањења активности трипсина у целом средњем цреву ларви обе врсте, при чему је уочено одсуство појединих изоформи у групама ларви третираних флуорантеном. Активност леуцин аминопептидазе је била значајно смањена у средњем цреву ларви *L. dispar* излаганих нижој концентрацији флуорантена, док је код ларви *E. chrysorrhoea* активност овог ензима показала супротан тренд, као и разлике у експресији детектованих изоформи. Такође је уочено повећање активности липазе код ларви ове врсте. Већа концентрација флуорантена у храни је имала инхибиторни ефекат на активност нелизозомских киселих фосфатаза код ларви *L. dispar*, док је мања концентрација загађивача довела до повећања активности укупних киселих и лизозомских киселих фосфатаза код ларви *E. chrysorrhoea*. На крају овог потпоглавља показане су разлике између врста у одговору дигестивних ензима на присуство различитих концентрација флуорантена у храни, помоћу канонијске дискриминационе и кластер анализе.

У шестој целини овог поглавља приказане су концентрације енергетских молекула, липида и трехалозе, у хемолимфи ларви излаганих флуорантену, при чему се уочава смањење концентрације трехалозе код ларви *L. dispar* излаганих мањој концентрацији флуорантена, док код ларви *E. chrysorrhoea* нема промена у укупном садржају енергетских молекула у хемолимфи.

Последње потпоглавље се бави анализом особина животне историје ларви, излаганих деловању органског загађивача, додатог храни. Ефекат хроничног присуства

различитих концентрација флуорантена у вештачкој хранљивој дијети је манифестован кроз смањење релативних брзина раста ларви обе врсте, као и смањење маса а продуженог трајања развића ларви *E. chrysorrhoea*. Већа концентрација флуорантена у храни је довела до продуженог трајања развића, а мања концентрација до смањења маса ларви *L. dispar*.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња је детаљно размотрила и објаснила добијене резултате, сагледавајући их кроз призму актуелних, и раније публикованих података студија везаних за ефекте флуорантена, и других ксенобиотика, на инсекте и друге организме. Анализом и повезивањем добијених резултата на различитим нивоима биолошке организације, после хроничног деловања флуорантена, кандидаткиња је уочила постојање повезаности утврђених промена и последица ефеката загађивача на ларве обе врсте. Дискутовањем добијених резултата, кандидаткиња је показала способност да објективно сагледа литературне податке и да у контексту размотрених података, сугерише потенцијална објашњења резултата докторске дисертације.

У поглављу **Закључци**, кандидаткиња је сумирала најзначајније резултате дисертације, наводећи их јасно и сажето. Ларве обе врсте испољиле су осетљивост на присуство средински релевантних концентрација флуорантена у храни, при чему је ефекат загађивача ткивно специфичан и узрокује различите обрасце промена активности и молекуларног диверзитета ензима, и других испитиваних параметара. Закључено је да присуство флуорантена у исхрани значајно утиче на активност антиоксидативних ензима супероксид димутазе и каталазе у различитим ткивима ларви обе врсте, што указује на могуће присуство реактивних кисеоничних врста, и представља физиолошки одговор на стрес. Индукција детоксификационих ензима, ткивно специфични обрасци експресије изоформи карбоксилестеразе, као и повећане специфичне активности карбоксилестеразе и глутатион С-трансферазе у ткиву средњег црева ларви *E. chrysorrhoea*, представљају физиолошку адаптацију врста на стресни ефекат загађивача. Механизми антиоксидативне заштите, индуковани флуорантеном, допринели су очувању физиолошки одговарајуће функције ацетилхолинестеразе, док је инхибиција активности карбоксилестеразе у мозгу ларви *L. dispar* такође могла допринети смањењу ефеката флуорантена на активност ацетилхолинестеразе. Смањење експресија Hsp70 у средњем цреву, а разлике у експресији овог протеина у мозгу ларви, указале су на различите одговоре у интензитету протеотоксичности изазване флуорантеном код различитих врста. Ефикасније варење

(активности дигестивних ензима и различита експресија њихових изоформи) упркос присуству загађивача, уочава се код ларви *E. chrysorrhoea*. Међутим, потрошња енергетских ресурса за индукцији механизма одбране у стресним условима, условила је промене особина животне историје ларви обе врсте.

Присуство флуорантена у храни довело је до разлика у експресији изоформи појединих ензима (карбоксилестераза, дигестивних ензима) средњег црева ларви без обзира на врсту, што указује на њихов биомаркерски потенцијал.

Индукција активности антиоксидативних и детоксификационих ензима, промене активности дигестивних ензима, као и разлике у експресији ензимских изоформи, детектоване код ларви обе врсте, део су физиолошког прилагођавања за превазилажење штетних ефеката органског загађивача флуорантена у храни. Резултати ове докторске дисертације доприносе проширењу оскудних знања у овој области и сагледавању физиолошких механизма прилагођавања фитофагних инсеката на све веће присуство органских загађивача у окружењу.

У поглављу **Литература**, кандидаткиња је навела 415 релевантних библиографских јединица, чиме је показала детаљан и систематичан приступ изучавању проблематике којом се бавила, током израде дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

Filipović, A., Mrdaković, M., Ilijin, L., Vlahović, M., Todorović, D., Grčić, A., Perić-Mataruga, V., 2019. Effect of fluoranthene on antioxidative defense in different tissues of *Lymantria dispar* and *Euproctis chrysorrhoea* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 224, 108565. **M21a.** [10.1016/j.cbpc.2019.108565](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108565)

Filipović, A., Mrdaković, M., Ilijin, L., Grčić, A., Matic, D., Todorović, D., Vlahović, M., Perić-Mataruga, V. 2021. Effects of fluoranthene on digestive enzymes activity and relative growth rate of larvae of lepidopteran species, *Lymantria dispar* L. and *Euproctis chrysorrhoea* L. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 249, 109123. **M21a.** [10.1016/j.cbpc.2021.109123](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109123)

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Физиолошко прилагођавање ларви губара, *Lymantria dispar* L., и жутотрбе, *Euproctis chryorrhoea* L., (Lepidoptera) на деловање флуорантена“, кандидаткиње Александре З. Филиповић, констатовано је да утврђено подудараре текста износи 23%. Детаљним увидом у Извештај, установљено је да се овај степен подудараре јавља као последица тзв. општих места и података, скраћеница назива хемикалија, описа метода за детекцију промена активности испитиваних ензима и других параметара и њихових скраћеница. Већи део подударности је уочен са докторским дисертацијама које су се бавиле сличним тематикама и модел организмом (органиски и неорганиски загађивач, фитофагна врста инсекта), као и сличном проблематиком (активности детоксификационих, антиоксидативних, и дигестивних ензима). Подударност се такође јавила као последица навођења литературних података, као и цитата претходно публикованих резултата докторандових истраживања проистеклих из саме дисертације и резултата проистеклих из истраживања реализованих у истраживачкој групи чији је докторанд члан, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, установљено је да извештај указује на оригиналност докторске дисертације „Физиолошко прилагођавање ларви губара, *Lymantria dispar* L., и жутотрбе, *Euproctis chryorrhoea* L., (Lepidoptera) на деловање флуорантена“, кандидаткиње Александре З. Филиповић, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију кандидаткиње Александре З. Филиповић Комисија констатује да је дисертација урађена у складу са циљем наведеним у пријави теме, те да садржи све релевантне елементе. У фазама експерименталног рада кандидаткиња је примењивала адекватне методе и технике, а у фазама анализе добијених

результата коришћене су одговарајуће статистичке методе. Резултати ове докторске дисертације су од великог значаја, јер проширују веома оскудна знања о деловању флуорантена на терестријалне, а посебно фитофагне врсте инсеката. Резултати испитивања утицаја средински релевантних концентрација флуорантена додатог храни, на ларве врста *L. dispar* L., и *E. chrysorrhoea* L., (ткивно-специфичне промене антиоксидативних и детоксификационих ензима, промене активности дигестивних ензима, диференцијална експресија ензимских изоформи, као и промене особина животне историје ларви), дају значајан научни допринос расветљавању физиолошких промена у присуству органског загађивача и механизма одбране, као и сагледавању физиолошког прилагођавања полифагних фитофагних врста инсеката на растуће присуство органских загађивача у окружењу. Кандидаткиња је показала добро познавање релевантне актуелне литературе за област истраживања, исказала изузетну посвећеност и истрајност, зрелост, прецизност и самосталност у раду, као и висок степен обучености у коришћењу савремених метода. Резултати проистекли из докторске дисертације Александре З. Филиповић су до сада публиковани у два међународна часописа изузетних вредности тј. категорија оба рада је M21a.

На основу изложеног, као и на основу квалитета објављених радова кандидаткиње, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Александре З. Филиповић, под називом „Физиолошко прилагођавање ларви губара, *Lymantria dispar* L., и жутотрбе, *Euproctis chrysorrhoea* L., (Lepidoptera) на деловање флуорантена“.

КОМИСИЈА:

У Београду, 21.09.2021. године

др Марија Мрдаковић, научни саветник,
Универзитет у Београду,
Институт за биолошка истраживања
„Синиша Станковић“ -Институт од националног
значаја за Републику Србију

др Синиша Ђурашевић, редовни професор,

Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Весна Перић Матаруга, научни саветник,
Универзитет у Београду,
Институт за биолошка истраживања
„Синиша Станковић“ -Институт од националног
значаја за Републику Србију