

NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.01.2022. godine, broj 11/III-3/6-JPP, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Promene u strukturi hromatina hepatocita i parametri oksidativnog stresa u jetri nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida“

kandidata asistenta dr Jovane Paunović Pantić, zaposlene na Katedri za patološku fiziologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Danijela Vučević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tatjana Radosavljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević, vanredni profesor Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija asistenta dr Jovane Paunović Pantić napisana je na 113 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 22 slike, odnosno grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o mentoru i komisiji, biografiju kandidata i izjave o autorstvu, istovetnosti i korišćenju.

U poglavlju **Uvod** dat je kratak prikaz primene savremenih kompjuterskih tehnologija u medicini sa posebnim osvrtom na tehnike koje se koriste u analizi dvodimenzionalnih signala. Opisana su dosadašnja istraživanja vezana za upotrebu fraktalne, teksturalne i vejevlet analiza u cilju kvantifikacije promena u jedarnoj strukturi i hromatinskoj organizaciji. Detaljno su predstavljeni ekvilibrijumski i fraktalni model organizacije jedarnog hromatina kao dva savremena koncepta u molekularnoj genetici. Ukazano je na potencijalno dejstvo različitih toksina na strukturu i organizaciju jedarnog hromatina hepatocita jetre. Konačno, predstavljena su trenutna saznanja o upotrebi nanočestica oksida gvožđa u medicini i o njihovoj potencijalnoj citotoksičnosti i hepatotoksičnosti.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Prvi cilj je bio da se ispita da li su metode fraktalne, teksturalne i vejevlet analize u mogućnosti da detektuju diskretne strukturne promene hromatina hepatocita uzrokovane nanočesticama gvožđe (II, III) oksida, koje nisu uočljive uz pomoć metoda konvencionalne svetlosne mikroskopije. Drugi cilj je predstavljao istraživanje uticaja nanočestica gvožđe (II, III) oksida na parametre oksidativnog stresa u jetri. Konačno, treći cilj istraživanja je bio da se odredi da li postoji povezanost matematičkih parametara strukturne organizacije hromatina hepatocita i oksidativnog statusa jetre u fiziološkim uslovima i nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisani ogledi na miševima soja C57BL/6. Prvo je prikazan eksperimentalni protokol, a zatim i biohemijske analize krvi i tkiva jetre. U sledećem segmentu je opisana histološka obrada tkiva jetre i kompjuterska analiza hromatinske organizacije hepatocita kao i algoritam kompjuterske teksturalne analize. Konačno, detaljno je objašnjen postupak fraktalne i matematičke vejevlet analize hromatinske strukture uz adekvatno navođenje odgovarajućih referenci. Ovo poglavlje ima šest slika koje prikazuju primer digitalnog mikrografa tkiva jetre, regione interesa hromatinskih struktura za GLCM analizu, primer programa korišćenog za fraktalnu analizu kao i različite načine računanja fraktalne dimenzije.

U poglavlju **Rezultati** tekstualno su detaljno opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati, uz adekvatne grafičke prikaze istih. Ovo poglavlje je podeljeno na četiri dela. U prvom delu su prikazani rezultati GLCM analize sa posebnim osvrtom na vrednosti angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije i GLCM varijanse. U drugom delu predstavljeni su osnovni rezultati fraktalne analize sa fokusom na vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti hromatinske strukture. U trećem delu su prikazani rezultati Harove diskretne vejevlet transformacije sa srednjim vrednostima različitih energijskih koeficijenata. Konačno, u četvrtom delu date su srednje vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

Poglavlje **Diskusija** je napisano jasno i pregledno, uz sistematski prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Prvo se diskutuje o primeni različitih nanomaterijala u medicinskim istraživanjima i činjenici da mali dijametar nanočestica omogućava da nesmatano prolaze kroz različite fiziološke barijere. Zatim su objašnjene specifičnosti nanočestica gvožđa i oksida gvožđa i pomenuti su nalazi drugih autora koji ukazuju da ove čestice mogu prouzrokovati oksidativni stres u nekim ćelijama i tkivima. Detaljno su objašnjeni mehanizmi nastanka oksidativnog oštećenja

dejavom reaktivnih jedinjenja kiseonika, kao i elementi antioksidativne zaštite. Zatim su diskutovane pojedinosti vezane za strukturne i ultrastrukturne karakteristike jetre i hepatocita kao i različiti hemijski agensi koji mogu da promene organizaciju i distribuciju hromatina u ovim ćelijama. Konačno, detaljno su prikazani nalazi drugih autora vezani za primenu fraktalne i teksturalne analize u fundamentalnim medicinskim istraživanjima.

Poglavlje **Zaključci** sažeto prikazuje najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada, a koji su u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja. Disertacija ima četiri jasno navedena i razumljiva zaključka.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 224 reference koje su ispravno navedene.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18) i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Promene u strukturi hromatina hepatocita i parametri oksidativnog stresa u jetri nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida“, autora Jovane Paunović Pantić, utvrđeno podudaranje teksta iznosi 6%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je postojanja odgovarajućih citata, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, kao i prethodno publikovanih rezultata istraživanja koji su proistekli iz disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika, odnosno ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je savremeni i inovativni metod GLCM analize, u pojedinim okolnostima, u mogućnosti da detektuje diskretne strukturne promene hromatina hepatocita uzrokovane nanočesticama gvožđe (II, III) oksida, koje nisu uočljive uz pomoć metoda konvencionalne svetlosne mikroskopije. Teksturalni parametri poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike su se značajno smanjili nakon izlaganja nanočesticama, što ukazuje na redukciju teksturalne homogenosti i uniformnosti jedarne strukture. Ostali parametri kao što su teksturalni kontrast, GLCM korelacija i GLCM varijansa su se takođe menjali na dozno-zavisni način što je u skladu sa prethodnim rezultatom.

Parametri fraktalne analize hromatinske organizacije hepatocita jetre se sa druge strane nisu značajno promenili nakon izlaganje nanočesticama gvožđe (II, III) oksida. Ovo se pre svega odnosi na srednje vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti kada se one računaju na osnovu informacija dobijenih iz dvodimenzionalnog signala. Ovaj nalaz ukazuje da ukupna kompleksnost hromatinske organizacije ostaje ista bez obzira na promene u teksturalnoj homogenosti i uniformnosti.

Takođe značajan rezultat je da izlaganje nanočesticama gvožđe (II, III) oksida u trajanju od sedam dana dovodi do značajnih promena u oksidativnom statusu jetre koje ukazuju na postojanje oksidativnog stresa. Primer je statistički značajno, dozno-zavisno povećanje vrednosti koncentracija malondialdehida i smanjenje koncentracije glutaciona. Ovaj rezultat je moguća posledica hepatotoksičnosti gvoždenih nanočestica u ovakvim eksperimentalnim

uslovima. Nije utvrđena povezanost matematičkih parametara strukturne organizacije hromatina hepatocita i oksidativnog statusa jetre u fiziološkim uslovima i nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida.

Verovatno najvažniji rezultat ove disertacije su opisane promene u GLCM i vevjlet parametrima hromatina hepatocita. Kombinovanje ovih indikatora hromatinske strukture ima potencijalnu primenu u stvaranju savremenih i inovativnih tehnika mašinskog učenja i veštačke inteligencije u cilju boljeg razumevanja diskretnih promena u tkivu jetre izazvanih metalnim nanomaterijalima. Ovakav savremeni pristup bi u budućnosti mogao dovesti do stvaranja inovativnih i preciznih biosenzora za detekciju diskretnih promena u hepatocitima nakon dejstva hepatotoksičnih hemijskih agenasa.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Uvidom u naučnu literaturu, može se zaključiti se nanočestice gvožđa i oksida gvožđa danas koriste u raznim oblastima industrije i biotehnologije, a u toku su intenzivna istraživanja njihove potencijalne upotrebe u dijagnostici i terapiji različitih oboljenja (Xiao & Di, 2020). Ove nanočestice imaju potencijal da budu efikasni nosači za razne lekove, kao i delovi različitih kompleksnih dijagnostičkih sistema. Do sada su sprovedene brojne studije koje su ispitivale potencijalnu primenu nanočestica gvožđe (II, III) oksida u okviru kontrastnih agenasa za nuklearnu magnetnu rezonancu, zatim u sklopu različitih bioeseja za detekciju patoloških procesa u organizmu, kao i konjugaciju sa lekovima poput citostatika, imunosupresiva i antibiotika (Popescu et al. 2019). Moguće je da u manjim dozama ove nanočestice nisu hepatotoksične, imajući u vidu da su pojedini istraživači nakon sprovedenih eksperimenata na laboratorijskim životinjama, nakon akutne i hronične ekspozicije, standardnom histopatološkom analizom zaključili da nema značajnih morfoloških promena (Paunovic et al. 2017). Međutim, neki autori ističu da njihova hepatotoksičnost i dalje nije dovoljno proučena i da su neophodna dodatna istraživanja u ovoj oblasti (Xiao & Di, 2020).

Poslednjih godina, pojavile su se određene indicije da gvozdeni nanomaterijali u nekim eksperimentalnim uslovima mogu prouzrokovati određena stanja i procese koji ukazuju na citotoksičnost. Ova citotoksičnost metalni može biti posledica oksidativnog stresa, odnosno stvaranja reaktivnih jedinjenja kiseonika poput superoksidnog anjona, vodonik-peroksida i hidroksilnog radikala (Malhotra et al. 2020). Moguće je da nanočestice gvožđe (II, III) oksida u jetri takođe dovode do oksidativnog stresa niskog intenziteta i da tako, i pored odsustva morfoloških promena (utvrđeno konvencionalnom histopatološkom analizom), ispoljavaju određeni stepen toksičnosti. Tokom poslednjih godina sprovedeno je nekoliko studija iz ove tematike sa oprečnim rezultatima (Vakili-Ghartavol et al. 2020; Malhotra et al. 2020; Wei et al. 2021). Rezultati ove disertacije ukazuju da nanočestice gvožđe (II, III) oksida pri određenim dozama mogu izazvati promene u parametrima oksidativnog stresa poput koncentracije malondialdehida u tkivu jetre što je u skladu sa prethodnim nalazima nekih autora (Malhotra et al. 2020; Wei et al. 2021)

Kompjuterski algoritmi za analizu dvodimenzionalnog signala primenjeni u ovoj disertaciji su pokazali da nanočestice gvožđe (II, III) oksida dovode do diskretnih morfoloških promena u hromatinskoj organizaciji hepatocita. Ovo je prvi put da su takve promene detektovane upotrebom tehnika tesksturalne i vevjlet matematičke analize i predstavljaju

osnovu za dalja istraživanja u ovoj oblasti. Posebno je važna buduća potencijalna upotreba ovih metoda u cilju stvaranja modela mašinskog učenja poput neuronskih mreža, drva odluke ili modela zasnovanih logističkoj regresiji kao što je opisano u prethodnim studijama (Davidovic et al. 2022). Ovakav pristup bi u budućnosti mogao da dovede do razvoja inovativnih, efikasnih i pristupačnih biosenzora za detekciju ćelijskog oštećenja u jetri nakon izlaganja različitim hemijskim agensima.

U prošlosti je pokazano da fraktalna dimenzija hromatina u pojedinim ćelijskim populacijama može biti značajan marker nekih stanja i bolesti asociranih sa dejstvom različitih toksičnih supstanci. Tako je, na primer kod kancerskih ćelija, fraktalna dimenzija hromatna ima čak i određenu prediktornu vrednost u pogledu tumorske progresije kao i prognostički značaj u kliničkoj evaluaciji bolesti (Metze et al. 2019). Moguće je da euhromatin i heterohromatin imaju različite vrednosti fraktane dimenzije, odnosno da promene u zapreminskom odnosu euhromatin / heterohromatin koje se dešavaju tokom apoptoze ili nekog drugog procesa bitno utiču na fraktalnu kompleksnost jedra kao celine. U ovoj disertaciji vrednost fraktalne dimenzije hromatina hepatocita se nije značajno promenila nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida što ukazuje da fraktalna analiza nije tako efikasan metod u detekciji diskretnih morfoloških promena u hepatocitima kao što je kod kancerskih i nekih drugih ćelija.

Sa druge strane, rezultati disertacije ukazuju na potencijalno veliku senzitivnost teksturalne (GLCM) i vejevlet matematičke analize u otkrivanju ovakvih morfoloških promena u jedru hepatocita. Ovo je u skladu sa prethodno publikovanim studijama koje su koristile GLCM tehniku u cilju analize obrazaca distribucije hromatina i jedarnog pleomorfizma u pojedinim ćelijama (Lee et al. 2021). Teksturalni parametri poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike su i ranije korišćeni za kvantifikaciju hromatinske homogenosti i uniformnosti u fiziološkim i patološkim uslovima (Kanai et al. 2020). Za razliku od teksturalne analize koja je relativno etablirana tehnika u mikroskopiji, pristup zasnovan na kvantifikaciji vejevlet energijskih koeficijenata koji je upotrebljen u ovoj disertaciji je relativno nov u smislu primene u medicini, i ova disertacija verovatno predstavlja prvo istraživanje u kome je vejevlet matematička analiza korišćena u cilju evaluacije dejstva nekog hemijskog agensa na jetru i hepatocite.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Paunovic J**, Vučević D, Radosavljević T, Vukomanović Djurdjević B, Stanković S, Pantić I. Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Structural Organization of Hepatocyte Chromatin: Gray Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microsc Microanal.* 2021;27(4):889-896. doi: 10.1017/S1431927621000532 (M21, IF=4.127)
2. **Paunovic J**, Vučević D, Radosavljević T, Mandić-Rajčević S, Pantić I. Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2020;316:108935. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108935 (M21, IF=5.194)
3. **Paunovic J**, Vučević D, Radosavljević T, Pantić S, Vesković M, Pantić I. Gray-level co-occurrence matrix analysis of chromatin architecture in periportal and perivenous

hepatocytes. Histochem Cell Biol. 2019;151:75-83. doi: 10.1007/s00418-018-1714-5 (M21a, IF= 3.418).

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Promene u strukturi hromatina hepatocita i parametri oksidativnog stresa u jetri nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida**“ dr Jovane Paunović Pantić predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju efekata metalnih nanomaterijala na hromatinsku organizaciju ćelija jetre. Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju prvi detaljan prikaz primene savremenih i inovativnih kompjuterskih algoritama fraktalne teksturalne i vejevlet analize u cilju detekcije diskretnih strukturnih promena u hromatinu hepatocita koje nisu uočljive metodama konvencionalne svetlosne mikroskopije. Rezultati disertacije takođe predstavljaju osnovu za dalja istraživanja iz oblasti patološke fiziologije i molekularne medicine. Po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji uz korišćenje raznovrsnih i savremenih molekularno-bioloških tehnika, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada, pa ova komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da usvoji pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji dr Jovane Paunović Pantić, i da odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 18.01.2022. godine

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Tatjana Radosavljević

Prof. dr Danijela Vučević

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević