

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 05.09.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Попов Александров и др Милене Катарановски о урађеној докторској дисертацији Марине М. Нинков, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под насловом „**Интестинални и системски имунски ефекти оралног уноса кадмијума код пацова**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. др Александра Попов Александров, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, ментор
2. др Милена Катарановски, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, ментор
3. др Весна Матовић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет, члан

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација кандидаткиње Марине М. Нинков под насловом „**Интестинални и системски имунски ефекти оралног уноса кадмијума код пацова**“ представља оригинално научно дело које обухвата 162 странице текста, 28 слика и 15 табела. Дисертација почиње резимеом на српском и енглеском језику (део без пагинације). Пагиниран текст (138 страна) се састоји од 7 поглавља и то: Увод (18 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (23 стране), Резултати (43 стране), Дискусија (20 страна), Закључци (2 стране) и Литература (31 страна) са 339 наведених библиографских јединица. Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је на Одељењу за екологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, а процедуре које су укључивале рад са животињама су одобрене од стране Етичког комитета истог института (решење бр. 03-07/15).

## Анализа докторске дисертације:

Кандидаткиња Марина Нинков је у овој докторској дисертацији испитивала ефекте орално унешеног кадмијума на интестиналне и системске имунске одговоре код пацова коришћењем Dark Agouti (ДА) и Albino Oxford (АО) сојева. Поглавље **УВОД** докторске дисертације почиње кратким описом историје токсичности кадмијума. Даље, дат је увид у досадашња сазнања о улози оксидативног стреса и инфламације као главних механизма који леже у основи токсичности кадмијума. Следеће је описан историјат штетних ефеката кадмијума на здравље људи а затим је дат приказ досадашњих истраживања токсичних ефеката кадмијума на експерименталним моделима где се наглашава се да су јетра и бубрег циљни органи токсичности, мада су токсични ефекти овог метала показани и на другим ткивима и системима органа (репродуктивни, респираторни, скелетни и кардиоваскуларни) док су најмање испитани ефекти кадмијума на имунски и гастроинтестинални систем. У даљем делу увода, кандидаткиња описује грађу и функцију имунског система и даје увид у до сада испитане имунотоксичне ефекте кадмијума код експерименталних животиња. Како је најчешћи вид изложености кадмијуму орални, при чему је гастроинтестинални тракт примарна мета штетних ефеката овог метала, кандидаткиња посвећује следећи део увода до сада малобројним испитаним имунотоксичним интестиналним ефектима кадмијума. Уз овај део дат је и кратак осврт на имунски систем црева уз наглашавање значаја одржавања хомеостазе имунских одговора у цреву као и улогу коменсалних бактерија у одржавању ове хомеостазе. У завршном делу увода, кандидаткиња је навела значај доприноса генетичке основе токсичним ефектима кадмијума показаним у јетри, плућима и тестисима експерименталних глодара. Истицањем недовољно испитаних механизма интестиналне имунотоксичности овог метала као и наглашавањем недостатка података о утицају генетичке основе на токсичне ефекте кадмијума у другим ткивима, кандидаткиња је указала на потребу даљих истраживања и дала основу за постављање следећих **ЦИЉЕВА РАДА**:

1. Карактеризација ефеката 30-дневне оралне примене кадмијума на имунски систем црева пацова испитивањем основних параметара имунског одговора у дуоденуму, региону највеће апсорпције кадмијума) и дренирајућим мезентеричним лимфним чворовима (МЛЧ).
2. Карактеризација ефеката оралне примене кадмијума на системском нивоу анализом хуморалних и ћелијских параметара запаљенске реакције у крви као и основних карактеристика урођеног и адаптивног имунског одговора у слезини, лимфном органу у коме се успостављају имунски одговори на антигене из крви.

У циљевима је указано и на потребу испитивања ефеката оралне апликације кадмијума на локалном и системском нивоу код два соја пацова, ДА и АО, за које је познато да успостављају квалитативно и / или квантитативно различит имунски одговор на исте стимулусе.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** је објашњен дизајн експеримента и детаљно су описане методе коришћене у овој дисертацији. Кандидаткиња је прво навела

хемикалије коришћене у експерименталним процедурама након чега је описала животињски модел коришћен у експериментима. Даље је објашњена метода атомске апсорпционе спектрометрије којом је одеђиван садржај кадмијума у ткивима. Дат је опис припреме ткива црева, слезине, јетре и бубрега за хистопатолошку анализу. У следећем делу поглавља, описане су методе које су коришћене за анализу ефеката оралног третмана кадмијумом на имунски одговор у цреву: анализа коменсалних микроба електрофорезом у градијенту денатуришућег агенса (енгл., Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / DGGE) и секвенционирање одабраних трака добијених DGGE методом, затим одређивање нивоа HMGB1 (енгл., High Mobility Group Box1) молекула методом Western Blot, одређивање параметара оксидативног стреса спектрофотометријски и одређивање концентрације цитокина (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10, имуноензимским тестом на чврстој фази - енгл., Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay/ELISA) у хомогенатима ткива дуоденума. У следећем делу овог поглавља описан је поступак изоловања ћелија из МЛЧ и слезине као и услови култивације изолованих ћелија и методе коришћене за испитивање фенотипских и функционалних карактеристика ових ћелија: тест пролиферативне активности ћелија заснован на уградњи радиоактивно обележеног тимидина у ДНК ћелија које се деле, процена апоптозе бојењем ћелија анексином 5 и пропидијум јодидом, метода проточне цитофлуориметрије (за анализу основних субпопулација ћелија МЛЧ и слезине) и одређивање концентрације цитокина (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 и IL-17) у кондиционираном медијуму ћелија (ELISA). Описана је анализа експресије гена за проинфламаторне цитокине (IL-1 $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$  и субјединице IL-12 и IL-23: p40, p19 и p35) и анти-инфламаторни цитокин IL-10 у ћелијама МЛЧ, и експресија гена за металотионеине 1 и 2/MT1, 2 у ћелијама МЛЧ и слезине. Затим су описани тестови за одређивање оксидативних активности ћелија МЛЧ и слезине (активност MPO, продукције азот монооксида, концентрације унутарћелијског GSH, продукција реактивних врста кисеоника). Следеће су описане методе којима су испитиване промене на системском нивоу, у периферној крви: мерење нивоа протеина акутне фазе, одређивање нивоа аланин-аминотрансферазе и аспартат-аминотрансферазе, одређивање концентрације цитокина (TNF, IL-1 $\beta$  и IL-6 у плазми - ELISA), мерење концентрације HMGB1 молекула, одређивање диференцијалног састава леукоцита и хематолошких параметара и мерење оксидативног стреса у еритроцитима. На крају, промене у бубрезима су процењене на основу мерења концентрације креатинина и  $\beta$ 2-микроглобулина у серуму и урину, као и одређивањем биохемијских параметара у урину. За статистичку обраду података је коришћен непараметарски Mann-Whitney U тест у програму STATISTICA 7.0. и вероватноћа мања од 0.05 је сматрана статистички значајном.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња је јасно приказала описно, бројчано и графички резултате спроведених истраживања. На почетку овог поглавља је показано да орални третман кадмијумом доводи до дозно зависне акумулације метала у цреву, МЛЧ и слезини и да су ови нивои слични код ДА и АО пацова. Овим резултатом кандидаткиња указује да генетска основа не утиче на концентрацију депонованог метала. Остали резултати су груписани у 5 тематских целина.

У првој целини су представљени ефекти оралног третмана кадмијумом на морфолошку грађу јетре и бубрега у којима су измерене највише концентрације метала.

У оквиру друге целине кандидаткиња указује на имуномодулаторне ефекте кадмијума на црево. Слични нивои кадмијума у ткиву црева ДА и АО пацова довели су до

већег степена оштећења ткива црева, некрозе ентероцита, израженије инфилтрације мононуклеарних леукоцита у ткиво црева и повећане продукције проинфламаторних цитокина (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17) код третираних ДА у односу на АО пацове а показана је и повећана концентрација анти-инфламаторног цитокина IL-10 у хомогенатима црева АО пацова. Такође су показане израженије промене активности ензима анти-оксидативне одбране (SOD, CAT, GST) у цреву ДА пацова. Код АО пацова је показано повећање нивоа липидних пероксида (малондиалдехид/MDA). Даље, испитивањем ефекта кадмијума на разноврсност и заступљеност коменсалних бактерија рода *Lactobacillus*, које имају битну улогу у успостављању и одржавању имунске хомеостазе у цреву, показано је да орални третман металом доводи до смањене заступљености лактобацила у цреву ДА пацова и њихово очување уз повећану заступљеност сојева *L. johnsonii* и *L. murinus* код АО пацова.

У оквиру треће целине је описан ефекат оралног третмана кадмијумом на ћелије МЛЧ, као лимфно ткиво у коме се успостављају имунски одговори на антигене из црева. Показане су промене у МЛЧ код третираних пацова оба соја (повећана маса, целуларност, продукција реактивних врста кисеоника) док је одговор ћелија МЛЧ на стрес у виду повећане експресије гена за МТ, повећаног нивоа унутарћелијског GSH, повећане пролиферативне и оксидативне активности ћелија МЛЧ и повећане експресије гена и продукције Th1/Tip1 (IFN- $\gamma$ ) и Th17/tip17 (IL-17) цитокина, као и повећање заступљености класично активисаних макрофага (CD68<sup>+</sup> ћелије) забележена само код ДА соја пацова.

У четвртој целини су приказани системски ефекти орално унешеног кадмијума на хуморалне и ћелијске параметре запаљенске реакције у периферној крви. Осим ефекта на активност анти-оксидативних ензима еритроцита оба соја пацова и повећане концентрације HMGB1 молекула само код ДА пацова, орални третман кадмијумом је имао слаб ефекат на хематолошке и биохемијске параметре у периферној крви пацова.

У оквиру пете, последње целине, представљени су ефекти оралног третмана кадмијумом на слезину. Хистопатолошки је показан негативан ефекат кадмијума на ћелије ендотела у слезини у виду региона крварења код оба соја пацова, али израженије код ДА соја. Третман кадмијумом није утицао на масу и целуларност слезине али је зато имао утицаја на смањену вијабилност и пролиферативну активност спленоцита, што су ефекти супротни онима у МЛЧ третираних пацова. Ипак, као и у МЛЧ, кадмијум је утицао на оксидативну активност (активност MPO, продукција NO) и продукцију цитокина (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17- нестимулисана продукција) само код ДА пацова. Повећана заступљеност неутрофилних гранулоцита (HIS48<sup>+</sup> ћелија) и повећана концентрација HMGB1 молекула у слезини доприносе проинфламаторном одговору спленоцита ДА пацова. У овом делу поглавља кандидаткиња излаже резултате којима се указује да исти ниво акумулираног кадмијума у МЛЧ и слезини индукује различит имунски одговор у ова два органа, што сугерише значај микросредине ткива при разматрању токсичности кадмијума.

Кандидаткиња у **ДИСКУСИЈИ** ове докторске дисертације садржајно, јасно и на критички научни начин разматра резултате које је приказала у претходном поглављу, цитирајући адекватну литературу. Из представљених резултата и њихове анализе у оквиру дискусије сумирани су **ЗАКЉУЧЦИ** у којима кандидаткиња указује на то да орални унос кадмијума доводи до оксидативног стреса и инфламације у цреву и МЛЧ пацова чиме су механизми који леже у основи индукције имунских интестиналних одговора на кадмијум први пут описани. Даље, и поред сличних нивоа кадмијума у цреву, слезини и МЛЧ код ДА и АО пацова забележене су сојне разлике у различитим аспектима имунског одговора чиме се, по први пут, истиче значај генетске основе у имунотоксичним ефектима оралне

изложености кадмијуму. Заједно, ови резултати указују на значај упоредног испитивања имунотоксичних ефеката кадмијума у различитим ткивима пацова као и паралелног испитивања ефеката код различитих сојева, чиме би се допринело бољем разумевању диференцијалних имуномодулаторних ефеката овог метала.

## **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

#### **1. M21a**

**Ninkov M**, Popov Aleksandrov A, Mirkov I, Demenesku J, Mileusnic D, Stojanov SJ, Golic N, Tolinacki M, Zolotarevski L, Kataranovski D, Brceski I. Strain differences in toxicity of oral cadmium intake in rats. Food and Chemical Toxicology, 2016; 96: 11-23.

#### **2. M21**

**Ninkov M**, Popov Aleksandrov A, Demenesku J, Mirkov I, Mileusnic D, Petrovic A, Grigorov I, Zolotarevski L, Tolinacki M, Kataranovski D, Brceski I. Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. Toxicology letters, 2015; 237: 89-99.

### **Б2. Радови у часописима домаћег значаја**

### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

#### **1. M34**

**Ninkov M**, Popov Aleksandrov A, Demenesku J, Mirkov I, Mileusnic D, Grigorov I, Petrovic A, Zolotarevski L, Nikolic M, Kataranovski M. Subchronic oral intake of low cadmium doses affects intestinal immune responses in rats. 3rd Belgrade EFIS symposium on

Immunoregulation: Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, May 24-27, 2015, Arandjelovac, Serbia, p48.

**Ninkov M**, Popov Aleksandrov A, Demenesku J, Mirkov I, Mileusnic D, Tolinacki M, Zolotarevski L, Kataranovski D, Brceski I, Kataranovski M. Oral cadmium intake and immune responses in the gut: intestinal inflammation and immune priming of mesenteric lymph nodes. 4th European Congress of Immunology, September 6-9, 2015, Vienna, Austria, p486.

Demenesku J, **Ninkov M**, Popov Aleksandrov A, Mirkov I, Mileusnic D, Zolotarevski L, Tolinacki M, Kataranovski D, Brceski I, Kataranovski M. Immunotoxicology of cadmium: Insight from acute intraperitoneal and intermediate period of oral exposure of rats. II Cadmium Symposium, June 25-27, 2015, Sassari, Italy, p31.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

**Ninkov M**, Popov Aleksandrov A, Mirkov I, Demenesku J, Brčeski I, Tolinački M, Jovanović S, Mileusnić D, Kataranovski D, Kataranovski M. Diferencijalni uticaj soja na imunsku reaktivnost: uvid iz regionalnih imunskih odgovora kod pacova. VII naučni sastanak Duštva imunologa Srbije, 27-28 April, 2016, Beograd, Srbija, p10.

#### **Мишљење и предлог Комисије:**

Докторска дисертација Марине Нинков под насловом: „**Интестинални и системски имунски ефекти оралног уноса кадмијума код пацова**“ представља оригинални научни рад у области имунобиологије, и уже у области имунотоксикологије. Кандидаткиња је у својој докторској дисертацији након добро написаног увода, јасно дефинисала циљеве научног рада и објаснила експериментални дизајн у коме су примењене адекватне методе истраживања. Тумачење и критичко разматрање резултата који су представљени у овој докторској дисертацији, користећи релевантне литературне податке, као и добра формулација закључака показују да кандидаткиња суверено влада теоријским начелима научних области које обухватају проблематику ове докторске дисертације.

Резултати ове дисертације који се тичу имунског одговора на кадмијум у цреву и главним лимфним чворовима који дренирају црево представљају значајан допринос разумевању имунских механизма који су у основи интестиналне токсичности овог метала. Они су показали различиту осетљивост сојева пацова на орални унос кадмијума, као и да имунотоксичност зависи од испитиваног ткива. При сличним нивоима депоновања

метала дошло је до индукције проинфламаторних одговора локално и на системском нивоу код ДА соја пацова, док је одговор на метал био мањег интензитета или је изостао код АО соја. Додатно, исти ниво кадмијума који је довео до инфламаторног одговора у мезентеричним лимфним чворовима, испољио је супресивно дејство на поједине параметре у слезини чиме је наглашен допринос микро средине посматраног ткива у токсикологији кадмијума. Резултати ове докторске дисертације јасно указују на имуномодулаторне механизме кадмијума и упућују на сагледавање овог метала као фактора здравственог ризика код људи и животиња.

На основу свега горе наведеног Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Марини Нинков јавну одбрану докторске дисертације под насловом: **„Интестинални и системски имунски ефекти оралног уноса кадмијума код пацова“**.

#### КОМИСИЈА:

---

Др Александра Попов Александров, научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, ментор

---

Др Милена Катрановски, редовни професор, Биолошки факултет Универзитета у Београду  
Научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“  
Универзитета у Београду, ментор

---

Др Весна Матовић, редовни професор,  
Фармацеутски факултет Универзитета у  
Београду, члан комисије

У Београду, 10.10.2016. године.