

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.07.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Славице Борковић-Митић, научног сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и др Небојше Јаснића, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **Марка Д. Прокића**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом **„Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима“** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

Др **Славица Борковић-Митић**, научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду,

Др **Небојша Јаснић**, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду,

Др **Зорица С. Саичић**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду,

Др **Имре Кризманић**, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду,

Др **Слађан Павловић**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду,

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Марка Д. Прокића, истраживача сарадника, под насловом „Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима“ садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област, Ужа научна област и УДК број), Садржај, Скраћенице, Текст рада по поглављима, Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу. Докторска дисертација је

написана на 199 страна, илустрована је са 8 слика, 35 табеле и 112 графикона и подељена је у 7 поглавља: Увод (34 стране), Циљ истраживања (2 стране), Материјал и методе (13 страна), Резултати (105 страна), Дискусија (19 страна), Закључци (3 стране) и Литература (19 страна са 203 референце).

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** дат је детаљан приказ досадашњих сазнања из области које су непосредно везане за предмет истраживања докторске дисертације. Објашњава се појам и формирање реактивних врста кисеоника (ROS) и описује механизам настанка оксидационих оштећења и оксидационог стреса. На основу најновијих литературних података дате су информације о функцији ензимских и неензимских компоненти антиоксидационог система као и холинестеразе. Описани су антиоксидациони ензими: супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), глутатион-редуктаза (GR) и ензим фазе II биотрансформације глутатион-S-трансфераза (GST), као и неензимске компоненте: глутатион (GSH) и слободне сулфхидрилне (SH) групе. Објашњени су појмови који се односе на хемијски и биолошки мониторинг животне средине и дата је основна подела биомаркера. Описан је процес којим метали доспевају у водену средину и како се у њој мења њихова концентрација, као и ефекти различитих концентрација акумулираних метала на живе организме. Ефекти пазличитих концентрација акумулираних метала на живе организме. У овој дисертацији дат је приказ свих испитиваних метала (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) и начин на који изазивају оксидациони стрес. Наведене су предности коришћења жаба у биомониторинг студијама акватичних екосистема. Наведене су основне карактеристике врста *Pelophylax esculentus* хибридног комплекса (*P. esculentus*, *P. ribibundus* и *P. lessonae*).

У поглављу **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА** јасно и концизно су изнети циљеви докторске дисертације: утврђивање могућих разлика у биоакумулацији метала у ткивима врста овог комплекса са различитих локалитета; одређивање активности и концентрација параметара антиоксидационог система и активности холинестеразе између три испитиване врсте жаба на испитиваним локалитетима; утврђивање промена параметара антиоксидационог система и активности холинестеразе под утицајем различитих концентрација акумулираних метала на испитиваним локалитетима; и испитивање потенцијалне употребе параметара антиоксидационог система и холинестеразе у биомониторингу као поузданих биомаркера који јасно одређују утицај различитих концентрација метала на испитиване врсте жаба, као и могућа употреба врста *P. esculentus* комплекса у биоиндикацији. Мерене су концентрације метала (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn), параметри антиоксидационог система (активност SOD, CAT, GSH-Px, GR и GST и концентрацију GSH и SH група) и активност холинестеразе у јетри, кожи и мишићима врста *P. esculentus*, *P. ribibundus* и *P. lessonae*.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описан је начин узимања узорака и карактеристике локалитета са којих су узорковане жабе: језеро Поповица у оквиру Националног парка “Фрушка гора”, Специјални резерват природе “Обедска Бара”, Парк природе “Поњавица” и Велики Бачки канал као део канала Дунав-Тиса-Дунав. У истраживању су коришћене све три врсте *P. esculentus* комплекса- родитељске врсте *P. ribibundus* и *P. lessonae* и њихов хибрид *P. esculentus*. Изловљавање испитиваних врста обављено је током три сезоне (пролеће 2013., пролеће 2014. и јесен 2014.). Мерна је дужина и маса сваке уловљене јединке, као и основни физичко-хемијски параметари воде.

Изолована су следећа ткива: јетра, кожа са дорзалног дела тела и мишићи задњих екстремитета. Након стандардних лабораторијских протокола припреме ткива: хомогенизовања, сонификовања и центрифугирања, урађена је биохемијска анализа параметара антиоксидационог система: активности SOD, CAT, GSH-Px, GR и ензима фазе II биотрансформације GST, концентрације GSH и SH група, као и активност холинестеразе. Поред наведених биохемијских анализа, измерена је концентрација метала у води и ткивима. За обраду добијених резултата коришћене су следеће статистичке методе: параметријски Анова-тест, канонијска дискриминациона анализа, кластер анализа, Пирсонове корелације и линеарна регресија.

Приказ **РЕЗУЛТАТА** организован је у складу са постављеним циљевима. Резултати експеримената приказани су табеларно и графички са објашњењима у легендама. Најважнији експериментални резултати изнети у овој докторској дисертацији обухватају више целина. Први део резултата укључује податке о измереним физичким и хемијским параметрима воде. Други део се односи на разлике између врста *P. esculentus* комплекса у концентрацијама акумулираних метала и параметара антиоксидационог система и холинестеразе. У трећем делу испитивани су ефекти различитих концентрација акумулираних метала (различитих локалитета) на параметре антиоксидационог система и активности холинестеразе врста *P. esculentus* комплекса. Такође, праћен је однос концентрације метала и активности антиоксидационих ензима и холинестеразе, као и концентрације глутатиона и SH група у ткивима.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** тумаче се добијени резултати и пореде се са досадашњим литературним сазнањима из дате области истраживања.

Ради бољег сагледавања, пратећи изложене функционалне целине, комисија истиче и анализира најзначајније резултате који су добијени у овој докторској дисертацији.

Резултати биоакумулације метала у ткиву јетре, коже и мишића врсте *Pelophylax esculentus* комплекса показали су да је врста *P. ridibundus* акумулирала највеће количине метала, а затим следе *P. esculentus* и *P. lessonae*. Разлике у биоакумулацији метала могу се повезати са животним навикама, хибернацијом, избором плена и величином тела ових врста. *P. ridibundus* је најкрупнија и увек хибернира у води, док остале две врсте имају ситније тело, другачији диверзитет плена и/или хибернирају на копну.

Од свих испитиваних параметара антиоксидационог система, ензими SOD, GSH-Px и концентрација SH група показали су највећу варијабилност код врста *Pelophylax esculentus* комплекса. Док је однос ензима CAT и GSH-Px у јетри одвојио *Pelophylax esculentus* од родитељских врста. *P. esculentus* је имала већу активност CAT и значајно мању активност GSH-Px у односу на *P. ridibundus* и *P. lessonae*. Добијени резултати указују на то да се поред различитих интеракција са спољашном средином (разлике у акумулацији метала) и физиолошких разлика (у базалном метаболизму) врсте овог комплекса разликују и у параметрима антиоксидационог система.

Међуткивне разлике у акумулацији метала између јетре, коже и мишића, као и АОС параметрима и активности холинестеразе врста *P. esculentus* комплекса показале су да јетра акумулира највећи број и највеће концентрације метала (посебно изражено у концентрацијама Fe, Cu, Al, Cd, Hg, и Ni), затим следи кожа која се издвајала по високим концентрацијама Mn, Zn и Cr, док су најниже концентрације метала забележене у мишићима. Параметри АОС и активност холинестеразе су имале највеће вредности у јетри, затим у кожи и у мишићима, што је у складу са концентрацијама акумулираних метала.

Ефекти различитих локалитета на врсте *Pelophylax esculentus* комплекса показују да се концентрације акумулираних метала у ткивима разликују од концентрација метала измерених у води, што указује да постоји повремено загађење, или су метали у ткива доспели на неки други начин (нпр., исхраном преко плена, или су у неком тренутку у току свог животног циклуса биле изложене повећаним концентрацијама метала). Општи тренд је да повећање загађења прати и већа акумулација метала у ткивима жаба, док се код параметара АОС не уочава јасан образац промене.

Однос концентрација метала и параметара АОС показује да врста *P. esculentus* има највећи број Пирсонових корелација, затим следи *P. ridibundus*, док је најмањи број корелација забележен код *P. lessonae*. Редокс активни метали који показују највећи ефекат на испитиване параметре код жаба су: Cr, As, Ni, Fe и Cu, а редокс неактивни: Hg и Cd. Међу параметрима АОС највећи број корелација са металима показују SH групе, затим SOD и GR. Од свих параметара антиоксидационог система који се користе као биомаркери, три наведена (SH групе, SOD и GR) се издвајају као врло ефикасни у биомониторингу ефекта различитих метала на ткива жаба *Pelophylax esculentus* комплекса.

Активност холинестеразе као параметар неуротоксичности показао је промене које су у директној вези са променама концентрација акумулираних метала, и то позитивне са Al, Zn и Cu и негативне са As и Hg. Ово указује да се и ChE може користити као биомаркер у студијама које прате присуство и ефекте метала код жаба.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно и концизно се износе закључци добијени анализирањем експерименталних резултата. У овој докторској дисертацији примењен је нови приступ у испитивању хибридног комплекса који је показао да се ове три веома блиске врсте разликују у акумулацији метала и параметрима антиоксидационог система и активности холинестеразе. Ове разлике представљају важну основу за даља испитивања како овог комплекса, тако и других хибридних врста и треба да пружи додатне информације у еколошким и екотоксиколошким студијама. Промене антиоксидационог система указују да се ови параметри, на првом месту SH групе, SOD и GR могу користити као биомаркери излагања и ефеката метала. На основу свега што је у овој студији забележено може се на крају закључити да су врсте *P. esculentus* комплекса погодни биоиндикатори присуства метала у животној средини.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** дата је листа од 203 библиографске јединице које су коришћене током израде ове докторске дисертације. За адекватно објашњење резултата ове докторске дисертације коришћена је најновија научна литература.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Prokić MD**, Borković-Mitić SS, Krizmanić II, Mutić J, Vukojević V, Nasia M, Gavrić J, Despotović SG, Gavrilović BR, Radovanović TB, Pavlović SZ, Saičić ZS (2016) Antioxidative responses of the tissues of two wild populations of *Pelophylax* kl. *esculentus* frogs to heavy metal pollution. *Ecotox Environ Safe* 128:21-29

2. Borković-Mitić SS, **Prokić MD**, Krizmanić II, Mutić J, Trifković J, Gavrić J, Despotović SG, Gavrilović BR, Radovanović TB, Pavlović SZ, Saičić ZS (2016) Biomarkers of oxidative stress and metal accumulation in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*). Environ Sci Pollut Res 23(10):9649-9659.
3. **Prokić MD**, Borković-Mitić SS, Krizmanić II, Gavrić J, Despotović SG, Gavrilović BR, Radovanović TB, Pavlović SZ, Saičić ZS (2015) Comparative study of oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the liver of *Pelophylax esculentus* complex frogs. Saudi Journal of Biological Sciences DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.09.003
4. **Prokić MD**, Borković-Mitić SS, Krizmanić II, Mutić J, Trifković J, Gavrić J, Despotović SG, Gavrilović BR, Radovanović TB, Pavlović SZ, Saičić ZS (2016) Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. Ecotoxicology DOI: 10.1007/s10646-016-1707-x

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Марка Д. Прокића, истраживача сарадника под насловом „Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима“ представља оригиналан научни рад са јасно осмишљеним, дефинисаним и оствареним циљевима. У овој докторској дисертацији коришћене су савремене експерименталне методе, а истраживања су обављена по свим критеријумима научно-истраживачког рада. Резултати ове докторске дисертације су јасно и концизно приказани, критички дискутовани, а закључци сажето изведени.

На основу свега изложеног, комисија закључује да је предвиђени предмет истраживања ове докторске дисертације веома актуелан и да даје релевантан одговор на постављене циљеве. Добијени резултати представљају значајан научни допринос јер су то први подаци о биоакумулацији метала и њиховим ефектима на антиоксидациони систем као и активност холинестеразе у ткивима јетре, коже и мишића врста жаба *Pelophylax esculentus* комплекса. Констатовано је да се све врсте овог комплекса могу користити као биоиндикатори присуства и ефеката метала као и да се испитивани антиоксидациони параметри и холинестераза могу користити као ефективни биомаркери за молекуларно физиолошки биомониторинг акватичних екосистема за које је карактеристично присуство метала и то пружа велики допринос на пољу екофизиологије.

Марко Д. Прокић, истраживач сарадник је током израде ове докторске дисертације показао висок степен компетентности, као и смисао за комплексне истраживачке приступе. Кандидат је препознатљив у својој области истраживања и до сада, поред радова који су проистекли директно из ове докторске дисертације, има 10 објављених научних радова у часописима међународног значаја.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидата Марка Д. Прокића, истраживача сарадника под насловом „**Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима**“.

КОМИСИЈА:

др Славица Борковић-Митић, научни сарадник
Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Универзитета у Београду

др Небојша Јаснић, доцент Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

др Зорица Саичић, научни саветник
Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Универзитета у Београду

др Имре Кризманић, доцент Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

др Слађан Павловић, научни саветник
Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Универзитета у Београду

У Београду, _____ 2016 године