

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.03.2020. године, на молбу ментора др Ларисе Илијин и др Сенише Ђурашевића одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације кандидата **Ање З. Грчић (рођена Гавриловић)**, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања „Сениша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под називом **„Биоиндикаторски потенцијал физиолошких одговора губара *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) на деловање бензо[а]пирена“** у саставу:

1. др Лариса Илијин, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Сениша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију
2. др Сениша Ђурашевић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет
3. др Весна Перић Матаруга, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Сениша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Ање З. Грчић** под насловом **„Биоиндикаторски потенцијал физиолошких одговора губара *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) на деловање бензо[а]пирена“**, написана је на 113 страна, садржи 42 слике и 5 табела и у њој је цитирано 328 научних публикација. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (12 страна), **Циљеви рада** (1 страна), **Материјал и методе** (13 страна), **Резултати** (48 страна), **Дискусија** (15 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (22 страна). Докторску дисертацију чине: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима и Прилози. 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:

Прво поглавље **Увод** садржи 6 потпоглавља. У првом и другом потпоглављу (**Бензо[а]пирен** и **Механизми токсичности бензо[а]пирена**) кандидаткиња анализира токсичност бензо[а]пирена по организме и механизме његовог деловања, позивајући се на релевантне литературне изворе, обзиром на важност проблематике праћења нивоа загађености животне средине овим полутантом. У трећем поглављу (**Одговори одбрамбених система инсеката на интоксикацију бензо[а]пиреном**), Ања З. Грчић је изнела бројне литературно доступне податке о одговору инсекатских антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион редуктазе), као и ензима који учествују у процесима детоксификације (карбоксилестеразе, ацетилхолинестеразе и

глутатион S-трансферазе). Такође, дат је приказ ефеката овог ксенобиотика на експресију протеина топлотног стреса (Hsp70) код инсеката. Образложен је и значај дигестивних ензима (протеаза, алкалних и киселих фосфатаза, гликозидаза и липаза) у екотоксикологији и детаљно су размотрени посредни и непосредни ефекти бензо[а]пирена на њихову активност. У потпоглављу „Бензо[а]пирен и особине фитнеса инсеката“ кандидаткиња је изнела доступне резултате о детектованом ефекту бензо[а]пирена на особине фитнеса инсеката (преживљавање, фекундитет, фертилитет, масе ларви, трајање развића). Поглављем „Биомаркери загађења животне средине“, Ања З. Грчић истиче значај примене методе интегрисаног одговора биомаркера у контроли квалитета животне средине, применом комбинације више биомаркера. Као посебно осетљиве истиче групу молекуларних биомаркера (гена, протеина и метаболита) чији су одговори брзи и лако мерљиви. Кандидаткиња посебно описује феномен повећане толеранције на загађење ксенобиотицима након дуге изложености популација загађујућим материјама, а који је забележен код бројних врста бескичмењака. Због ове појаве се и део истраживања односио на испитивање ефеката порекла популације *L. dispar* на потенцијалне биомаркере загађења.

У поглављу **Циљеви** Ања З. Грчић као циљеве дисертације наводи: одређивање специфичних активности антиоксидативних, детоксификационих, дигестивних ензима, липазе и α -глукозидазе у средњем цреву ларви *L. dispar* и анализа детектованих изоформи ових ензима; одређивање специфичних активности антиоксидативних ензима и анализа детектованих изоформи ових ензима, као и утврђивање концентрације липида и трехалозе у хемолимфи ларви; испитивање промена у концентрацији протеина топлотног шока Hsp70, карбоксилестеразе и ацетилхолинестеразе у средњем цреву и мозгу ларви *L. dispar* петог ларвеног ступња, након интоксикације бензо[а]пиреном. Као један од циљева ове докторске дисертације, кандидаткиња наводи одређивање ефеката бензо[а]пирена на особине фитнеса (преживљавање, масу ларви и релативну брзину раста V ларвеног ступња и параметре трајања развића). Обзиром да одабрани параметри припадају различитим нивоима биолошке организације, као један од главних циљева кандидаткиња је навела испитивање ткивне специфичности њихових одговора након хроничне изложености ларви нижој и вишој концентрацији бензо[а]пирена, али и зависност одговора испитиваних параметара од ефекта порекла популације.

Поглавље **Материјал и методе** детаљно описује биологију врсте, порекло животиња коришћених у експериментима, експерименталне третмане, као и примењене експерименталне технике. У потпоглављу „Експерименталне групе“ описано је формирање експерименталних третмана које је обухватало контролну групу и две групе ларви хронично третираних са 5 и 50 ng бензо[а]пирена /g суве хране. Третман је укључивао популацију ларви из незагађених шума (локалитет Мајданпек) и из загађених шума (локалитет Бор), а трајао је од излегања ларви до жртвовања трећег дана петог ларвеног ступња. Током третмана праћени су, у обе популације и на свим третманима, следећи параметри: преживљавање ларви, маса ларви, релативна брзина раста (за период од уласка ларви у трећи ступањ, па све до трећег дана петог ларвеног ступња), трајање појединачних ступњева развића и укупно трајање развића до жртвовања. Специфичне активности антиоксидативних ензима и дигестивних ензима у средњем цреву и хемолимфи *L. dispar* одређене су спектрофотометријски, а њихове изоформе одређене су техником зимограма. Специфичним континуалним спектрофотометријским есејима одређене су активности карбоксилестеразе и ацетилхолинестеразе у средњем цреву и мозгу ларви *L. dispar*. Концентрација трехалозе и липида у хемолимфи ових ларви одређивана је спектрофотометријски. За утврђивање нивоа Hsp70 у средњем цреву примењен је Western blot, а у узорцима мозга Western blot и ELISA тест. Квантитативна

анализа електрофоретских трака урађена је употребом софтвера ImageJ (National Institutes of Health, USA). Методом интегрисаних одговора биомаркера одређене су групе биомаркера осетљиве на деловање овог ксенобиотику. За статистичку обраду резултата примењен је софтвер GraphPad Prism v.5.00.

Резултати су подељени у 7 подцелина у оквиру којих су представљени сви добијени експериментални резултати. Анализе добијених резултата представљене су главним текстом, који на адекватан начин допуњују слике и табеле уз примену одговарајуће статистичке обраде резултата. У првом одељку приказани су ефекти бензо[*a*]пирена на активност антиоксидативних ензима: супероксид дисмутазу, каталазу и глутатион редуктазу средњег црева и хемолимфе ларви *L. dispar*, пореклом из загађених и загађених шума. У ткивима средњег црева ларви из загађене шуме каталазна активност је била смањена, док је код јединки пореклом из загађене шуме активности супероксид дисмутаза и каталазе значајно индукована у средњем цреву, после третмана бензо[*a*]пиреном. Глутатион редуктаза није показала промену своје активности ни на вишој ни на нижој концентрацији бензо[*a*]пирена, у обе третиране популације ларви *L. dispar*. У хемолимфи ових ларви само је каталаза показала дозно-зависну осетљивост у популацији пореклом из загађене шуме. У другој целини кандидаткиња је приказала резултате који се односе на ефекте интоксикације бензо[*a*]пиреном на активност детоксификационих ензима средњег црева и хемолимфе *L. dispar*. Повећана активност карбоксилестераза средњег црева ларви из загађене шуме је била у корелацији са повећањем концентрације бензо[*a*]пирена, док је код ларви из загађене шуме, анализом електрофоретских профила, регистровано присуство потпуно нове изоформе овог ензима у средњем цреву, која није присутна код ларви пореклом из загађене шуме. Ларве *L. dispar* у обе популације показују мању осетљивост карбоксилестераза и ацетилхолинестераза у мозгу на излагање овом ксенобиотику. Ларве пореклом из загађене шуме одликује значајно повећање специфичне активности глутатион S-трансферазе у средњем цреву, док у популацији ларви из загађене шуме нису забележене промене у активности овог ензима. Треће потпоглавље приказује резултате експресије протеина топлотног стреса Hsp 70 у средњем цреву и мозгу ларви *L. dispar*. Утврђено је да нижа концентрација бензо[*a*]пирена индукује експресију Hsp70 у мозгу ларви пореклом из загађене шуме, док је у популацији пореклом из загађене шуме смањена експресија овог протеина у средњем цреву. У четвртој целини анализирани су промене специфичне активности дигестивних ензима средњег црева ларви након хроничног излагања овом ксенобиотику. Дуготрајна исхрана дијетом са додатком бензо[*a*]пирена индуковала је пад активности трипсина и леуцин аминопептидазе у средњем цреву само код ларви пореклом из загађених шума. Када су у питању алкалне, укупне киселе, лизозомске киселе, нелизозомске киселе фосфатазе, као и α -глукозидазе у средњем цреву ларви, хронична интоксикација бензо[*a*]пиреном изазвала је смањење једино специфичне активности алкалних фосфатаза у популацији пореклом из загађених шума. У следећој целини кандидаткиња је приказала резултате промене концентрације енергетских молекула, трехалозе и липида у хемолимфи и специфичне активности липаза у средњем цреву ларви. Након излагања овом ксенобиотику, детектован је само пораст специфичне активности липаза средњег црева ларви у обе популације ларви, као и концентрација липида код јединки пореклом из загађених шума. Анализа особина фитнеса је представљена у шестом поглављу. Обе концентрације бензо[*a*]пирена доводе до значајног смањења маса ларви петог ларвеног ступња, у обе популације *L. dispar*, док је продужено развиће ларви забележено једино код оних пореклом из загађене шуме, и то под утицајем ниже дозе овог полутанта. Релативна брзина раста значајно је смањена у обе популације ларви под утицајем концентрације од 5 ng бензо[*a*]пирена /g суве хране. Нижа концентрација 5 ng бензо[*a*]пирена /g суве хране је у већој мери утицала на

преживљавање ларви пореклом из загађене шуме, док су ларве пореклом из незагађене шуме смањиле стопу преживљавања након излагања вишој концентрацији (50ng бензо[*a*]пирена /g суве хране). У последњем одељку овог поглавља кандидаткиња је приказала анализу ИБР индекса. Уочава се да сет детоксификационих ензима и сет дигестивних ензима показују јасно дозно-зависно повећање ИБР индекса у обе популације ларви, тако да имају добар потенцијал за детекцију хроничног загађења бензо[*a*]пиреном, независно од порекла ларви. Такође, две батерије биомаркера - ензими антиоксидативне одбране и параметари фитнеса ларви, карактерише изразит дозно -независни раст ИБР индекса, код обе популације ларви, због чега кандидаткиња истиче да нису добри кандидати за примену у биомониторингу загађења овим ксенобиотиком.

У поглављу **Дискусија** детаљно су објашњени добијени резултати и упоређени су са доступним литературним подацима из истраживаних области. Кандидаткиња је добијене одговоре посматраних параметара, који припадају различитим нивоима биолошке организације (молекуларном, биохемијском и новоу целог организма), анализирала у оквиру ефеката хроничног излагања различитим концентрацијама бензо[*a*]пирена (вишој и нижој концентрацији), али и са аспекта различитог порекла излаганих популација (из незагађених и загађених шума). На крају овог поглавља описала је параметре који су се издвојили као потенцијални биомаркери на интоксикацију бензо[*a*]пиреном, јер су показали или дозно зависну осетљивост или им је одговор зависио од порекла излаганих ларви, односно њиховог претходног контакта са полутантима.

У поглављу **Закључак**, сумирани су најзначајнији резултати ове студије. Кандидаткиња је истакла научни значај ове дисертације, односно добијених и анализираних резултата о ефектима хроничне изложености ларви *L. dispar*, пореклом из две популације које су различито осетљиве на антропогено загађење, вишој и нижој концентрацији бензо[*a*]пирена, на физиолошке параметре важне у одговору на стрес, као и њихова могућа примена у биомониторингу. Кандидаткиња је закључила да су антиоксидативни ензими показали повећану активност у ткивима средњег црева ларви пореклом из загађених шума, док је код ларви пореклом из незагађених шума оваква промена детектована у хемолимфи. Хронично излагање бензо[*a*]пирену формира различите обрасце експресије карбоксилестераза у средњем цреву ларви, зависно од популационог порекла, што може бити потенцијални показатељ присуства овог ксенобиотика у шумским екосистемима. Потенцијални показатељ хроничног присуства овог полицикличног ароматичног угљоводоника у загађеним шумским системима, је и глутатион S-трансфераза, јер је детектована повећана активност овог ензима само у средњем цреву ларви пореклом из загађених шума, након излагања бензо[*a*]пирену. Насупрот овим параметрима, ниво експресије протеина топлотног стреса Hsp70, показао је дозно-зависно повећање у средњем цреву обе популације ларви, након излагања овом ксенобиотику, у односу на контролне групе. Дозно-зависан пад активности након хроничног излагања бензо[*a*]пирену, кандидаткиња је детектовала и код дигестивних ензима (трипсин и леуцин аминопептидаза) средњег црева ларви пореклом и из незагађене и из загађене шуме. Такође, добијени резултати сугеришу да је активирање липидног катаболизма доминантни извор метаболичке енергије у адаптивном одговору ларви пореклом из незагађене популације на хронично стање стреса, изазвано излагањем бензо[*a*]пирену. Укупно метаболичко стање ларви у овом експерименту сугерише енергетски дефицит који се огледа у њиховој смањеној маси, што је извесно узрок и продуженог развића ларви пореклом из загађене шуме. Кандидаткиња је анализом ИБР индекса показала да сет детоксификационих ензима и сет дигестивних ензима показују јасно дозно-зависно повећање ИБР индекса у обе популације, тако да они имају добар

потенцијал за детекцију хроничног загађења бензо[а]пиреном, независно од порекла ларви. Посебно је истакла веће разлике у вредностима ИБР индекса, после различитих третмана бензо[а]пиреном и то код свих испитаних батерија биомаркера, у популацији ларви из загађене шуме што може бити значајан показатељ разлика у осетљивости популација *L. dispar* различитог порекла.

У поглављу **Литература** кандидаткиња је навела 328 библиографских јединица, које представљају најважније изворе података значајних за тему ове докторске дисертације, а којим се објашњавају и/или потврђују добијени резултати.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

- 1 (M21) **Gavrilović, A.**, Pijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Mrkonja, A., Matić, D., Perić-Mataruga, V. (2017). Effects of benzo[*a*]pyrene dietary intake to antioxidative enzymes of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere*, 179, 10-19. (Environmental Sciences, 35/242, IF₂₀₁₇ = 4,427)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517304526?via%3Dihub>

2. (M23) **Grčić, A.**, Pijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Filipović, A., Đurašević, S., Perić-Mataruga, V. (2019): Benzo[*a*]pyrene-induced changes in carboxylesterase, acetylcholinesterase and heat shock protein 70 of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) from unpolluted and polluted forests. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*. (Biology, 72/85, IF₂₀₁₇ = 0,648)

<https://doi.org/10.2298/ABS190620056G>

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извршена је провера оригиналности докторске дисертације аутора Ање З. Грчић под називом „Биоиндикаторски потенцијал физиолошких одговора губара *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) на деловање бензо[а]пирена”, у програму iThenticate. Извештај провере указује да степен подударности текста износи 13%, што је последица тзв. општих места и података и скраћеница назива хемикалија, уређаја и ензима, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује да ова докторска дисертација представља оригинални допринос кандидаткиње Ање З. Грчић, као и да њена проблематика, дизајн, резултати, дискусија и закључци нису преузети из неког другог извора.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Ање З. Грчић (рођена Гавриловић), под насловом „Биоиндикаторски потенцијал физиолошких одговора губара *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) на деловање бензо[*a*]пирена“, представља важан научни допринос у утврђивању токсичности високе и ниске концентрације бензо[*a*]пирена на ларве *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera). Комисија сматра да је ова дисертација у потпуности урађена и написана у сагласности са предложеним програмом у одобреној пријави. Истраживање у оквиру докторске дисертације засновано је на савременим сазнањима, а кандидаткиња је применила адекватне методе и технике истраживања у складу са циљевима наведеним у пријави теме. У фазама обраде података и интерпретације резултата, такође су примењене адекватне статистичке процедуре, а дисертација садржи све адекватне елементе.

Комисија констатује да приказани резултати дају важан научни допринос разумевању хроничне токсичности овог полицикличног ароматичног угљоводоника. Кандидаткиња је посебно истакла оне ткивно специфичне физиолошке параметре који су показали дозно-зависну промену и оне који су карактеристични за порекло ларви (незагађене и загађене шуме). Посебан значај ове докторске дисертације је утврђивање батерија ткивно специфичних физиолошких одговора са биоиндикаторским потенцијалном који могу бити коришћени у будућим екотоксиколошким истраживањима.

На основу свега изложеног, као и квалитета радова које је кандидат објавио, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Ање З. Грчић под насловом „Биоиндикаторски потенцијал физиолошких одговора губара *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) на деловање бензо[*a*]пирена“

У Београду, 13.03.2020. године.

КОМИСИЈА:

др Лариса Илијин, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију

др Синиша Ђурашевић, ванредни 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