

Биолошки факултет
Број захтева: 33/178-1
Датум: 10.7.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Јелена П. Гаврић**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Анимална и хумана физиологија.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Параметри оксидационог стреса и биотрансформациони ензими као биомаркери излагања металима у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix* L.) и рибарице (*Natrix tessellata* Laurenti) из Обедске баре и Панчевачког рита у периоду пре и после хибернације“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 30.04.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1738/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обедске баре и Панчевачког рита“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 15.05.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/102-15.05.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Слађан Павловић	научни саветник	екофизиологија животиња	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
2.	др Синиша Ђурашевић	ванредни професор	физиологија животиња и човека	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
3.	др Небојша Јаснић	доцент	физиологија животиња и човека	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
4.	др Зорица Саичић	научни саветник	екофизиологија животиња	Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
5.	др Љиљана Томовић	ванредни професор	морфологија, систематика и филогенија животиња	Универзитет у Београду- Биолошки факултет

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 10. јула 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/178-10.7.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IX редовној седници одржаној 10.7.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Јелене Гаврић, под називом:

„Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обедске баре и Панчевачког рита“.

Универзитет је дана 30.04.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1738/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Gavrić, J.P.**, Prokić, M.D., Anđelković, M.Z., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Borković-Mitić, S.S., Radovanović, T.B., Tomović, Lj.M., Pavlović, S.Z. and Saičić, Z.S. (2014). Effect of metals on blood oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in dice snake (*Natrix tessellata*) from Serbia. Archives of Biological Sciences, Belgrade, 67, 303-315. **M23**

2. **Gavrić, J.**, Prokić, M., Despotović, S., Gavrilović, B., Radovanović, T., Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Saičić, Z. (2015). Biomarkers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the blood of Grass snake (*Natrix natrix* L.) during prehibernation and posthibernation periods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 443-453. **M23**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 17.04.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Слађана Павловића, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и др Синише Ђурашевића, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду за оцену испуњености услова и научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Јелене П. Гаврић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом: **“Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обедске баре и Панчевачког рита“**. На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 15.05.2015. године одређена је Комисија за преглед и оцену урађене докторске дисертације у саставу:

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

Др Синиша Ђурашевић, ванредни професор Биолошког факултета 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 Љиљана Томовић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у
Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Јелене П. Гаврић, истраживача сарадника, под насловом:
“Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима

белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обедске баре и Панчевачког рита“ 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 кти УДК број), Скраћенице, Садржај, Текст рада по поглављима, Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штапане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу. Докторска дисертација је написана на 212 страна, илустрована је са 6 схема, 11 слика, 80 табела и 68 графика и подељена је у 7 поглавља: Увод (32 стране), Циљ истраживања (2 стране), Материјал и методе (17 страна), Резултати (107 страна), Дискусија (27 страна), Закључци (4 стране) и Литература (23 стране са 223 библиографске јединице).

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** дата је дефиниција оксидационог стреса и описани су основни кораци при редукцији молекулског кисеоника. Објашњен је механизам настајања слободних радикала кисеоника у организму у нормалним стањима, као и у околностима нарушене редокс хомеостазе. Дат је преглед реактивних врста кисеоника (РОС), њихових нормалних физиолошких функција, као и последица њихове повећане продукције. Дефинисани су и описани основни појмови о биомониторингу и основне карактеристике биомаркера. У односу на хемијске маркере који дају само квалитативни опис стања животне средине, биомаркери не само да показују присуство загађивача у води или организму, већ дају одговор и на питање о ефектима загађивача на организме. Као посебну групу биохемијских биомаркера кандидат издваја биомаркере оксидационог стреса, и то: ензимске компоненте система заштите од оксидационих оштећења - супероксид-дисмутазу (SOD), каталазу (CAT), глутатион-пероксидазу (GSH-Px), глутатион-редуктазу (GR), као и неензимске компоненте система заштите од оксидационих оштећења - глутатион (GSH) и сулфхидрилне групе (SH). Даље је описана липидна пероксидација (TBARS), као један од биохемијских показатеља оксидационих оштећења липида. У даљем тексту кандидат је дао приказ процеса биотрансформације кроз механизам деловања ензима фазе I биотрансформације, а посебно система цитохрома P₄₅₀1A (CYP1A). Описан је ензим фазе II биотрансформације глутатион-S-трансфераза (GST), који је уједно и један од ензима који може да се уброји у ензимске компоненте система заштите од оксидационих оштећења. У даљем излагању о биомаркерима, кандидат је описао металотионеине као биомаркере изложености металима, као и холинестеразе као биомаркере неуротоксичности. Посебан део текста се односи на метале где је описана њихова улога у физиолошким процесима, као и у условима када поједини метали испољавају токсичност. Објашњени су механизми продукције слободних радикала изазване металима, као и процеси биоакумулације метала. Кроз следеће поглавље, кандидат је дао литературни приказ досадашњих истраживања која су у области екофизиологије спроведена на змијама. Једна од специфичних адаптација код змија -

хибернација је посебно детаљно описана. Такође, детаљно су описане све специфичности параметара који су истраживани у овој докторској дисертацији код змија. Као последњи део увода, објашњене су основне биолошке карактеристике испитиваних врста змија: белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*). На тај начин увод је заокружен као целина и даје потпуни увид у литературни приказ досадашњих релевантних истраживања у овој области и објашњава термине који ће се користити у даљем тексту докторске дисертације.

У поглављу **ЦИЉ ИСТАЖИВАЊА** сажето је изнет и образложен циљ докторске дисертације, и то: да се испита утицај метала присутних у животној средини и њихова биоакumulација у неким ткивима белоушке и рибарице са различитих локалитета на промене биомаркера оксидационог стреса, фазе I и фазе II биотрансформације и биомаркера неуротоксичности у крви, јетри, бубрегу, мишићу и масном ткиву две семиакватичне врсте змија: белоушке (*N. natrix*) и рибарице (*N. tessellata*) у периоду пре и после хибернације, изловљених у специјалном резервату природе - Обедска бара и индустријској зони - Панчевачки рит. Наведени су сви параметри који су праћени у овој докторској дисертацији, и то: параметри оксидационог стреса (супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), глутатион-редуктаза (GR), укупни глутатион (GSH), слободне сулфхидрилне групе (SH), ниво експресије ензима фазе I биотрансформације (CYP1A), активност ензима фазе II биотрансформације глутатион-S-трансферазе (GST), активност холинестеразе као параметар неуротоксичности (ChE), ниво липидне пероксидације (TBARS) и ниво експресије металотионеина (MT). Описано је који метали ће бити анализирани у води и ткивима јетре и мишића. Кандидат наводи да се ради о хемијски разнородним металима који припадају следећим групама периодног система елемената: алкални (Li, K), земноалкални (Ba, Ca, Mg), прелазни (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), слаби метали (Al, Pb), као и металоид As. Кандидат објашњава да је одабрани локалитет Обедска бара са релативно малим антропогеним утицајем, док је локалитет Панчевачки рит изузетно изложен деловању човека, па се самим тим очекује различит ниво метала у животној средини и ткивима и њихов различити утицај на испитиване параметре. Такође, како су змије хибернатори, кандидат је поставио као циљ и ефекат овог феномена на испитиване параметре. Утврђиване су и разлике између испитиваних врста. Циљ ове докторске дисертације је такође био, да се утврди да ли врсте змија *N. natrix* и *N. tessellata* могу да се користе као биоиндикатори и биомонитори у процени стања животне средине, који од испитиваних параметара су најпоузданији биомаркери, као и даље перспективе у овој области, као што су стандардизација референтних вредности биомаркера и развијање неинвазивних техника узорковања.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описане су стандардне биохемијске методе коришћене у реализацији постављених циљева. Поглавље је конципирано тако да су прво дате основне карактеристике испитиваних локалитета, затим технике узорковања врста коришћених у експериментима, начин припреме ткива, биохемијске анализе, и на крају статистичка обрада резултата. Змијама су после

изловљавања мерене дужина и телесна маса и ови подаци су коришћени за одређивање кондиционог фактора (CF). Змије су жртвоване декапитацијом без анестезије. Крв је сакупљана у хепаринизоване епрувете. Пуна крв је коришћена за одређивање концентрације липидних пероксида (TBARS), а плазма за одређивање концентрације укупног глутатиона (GSH) и активности глутатион-С-трансферазе (GST) и холин естеразе (ChE). Ензими система заштите од оксидационих оштећења су одређивани у лизату еритроцита. За одређивање активности CuZn SOD из лизата еритроцита је претходно посебном методом уклоњен хемоглобин. Изолована су следећа ткива: јетра, бубрег, мишић и масно ткиво. Сва ткива су после изоловања мерена, а маса јетре је коришћена за одређивање хепатосоматског индекса (HSI). Ткива су припремана стандардним лабораторијским методама које укључују хомогенизовање, сонификовање и ултрацентрифугирање. У супернатантима су одређивани сви параметри оксидационог стреса (супероксид-дисмутаза-SOD, каталаза-CAT, глутатион-пероксидаза-GSH-Px, глутатион-редуктаза-GR, укупни глутатион-GSH, слободне сулфхидрилне групе-SH, ниво експресије ензима фазе I биотрансформације-CYP1A, ензим фазе II биотрансформације глутатион-С-трансфераза-GST, активност холинестеразе као параметра неуротоксичности-ChE, ниво липидне пероксидације-TBARS и ниво експресије металотионеина-MT).

Детекција хемијских елемената у води и ткиву јетре и мишића вршена је методом индуктивно спрегнуте плазма спектроскопије ICP-OES (Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germany). У узорке воде са испитиваних локалитета је после филтрације додата одређена количина концентроване азотне киселине. За сваки узорак мерења су понављана 5 пута, а вредности концентрација су у $\mu\text{g/L}$ воде (ppb). У води је извршена детекција следећих хемијских елемената: Ag, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sr, Tl и Zn. Limiti detekcije ($\mu\text{g/L}$) za određivane elemente su: Ag - 0.471, Al - 3.091, As - 6.666, B - 0.226, Ba - 0.016, Bi - 4.638, Ca - 1.721, Cd - 0.238, Co - 0.829, Cr - 0.490, Cu - 10.458, Fe - 13.234, Hg - 2.211, In - 3.669, K - 6.434, Li - 2.771, Mg - 5.753, Mn - 7.305, Mo - 6.573, Na - 6.593, Ni - 11.352, Pb - 2.996, Sr - 3.325, Tl - 1.947 и Zn - 0.362. Узорци ткива су за анализу метала припремани на посебан начин. Наиме, узорци ткива јетре и мишића су прво лиофилизоване, а затим дигестирани у смеси азотне киселине и водоник пероксида (према процедури и програму произвођача уређаја, SpeedwaveTM MWS-3+, Berghof Products, Instruments GmbH, Eningem, Germany). После хлађења, узорци су разблажени до 25 mL редестилованом водом. Таласне дужине које су коришћене за детекцију елемената, биле су: Al - 396.152 nm, As - 197.262 nm, Ba - 230.424 nm, Ca - 370.603 nm, Cd - 226.502 nm, Co - 228.616 nm, Cr - 267.716 nm, Cu - 324.754 nm, Fe - 259.941 nm, K - 776.491 nm, Li - 460.289 nm, Mg - 285.213 nm, Mn - 257.611 nm, Mo - 202.095 nm, Ni - 231.604 nm, Pb - 220.353 nm и Zn - 213.856 nm. Лимити детекције (mg/L) за одређиване метале били су: Al - 0.006, As - 0.011, Ba - 0.0001, Ca - 0.014, Cd - 0.0002, Co - 0.0007, Cr - 0.0004, Cu - 0.0016, Fe - 0.0003, K - 0.003, Li - 0.065, Mg - 0.0002, Mn - 0.00003, Mo - 0.0007, Ni - 0.0004, Pb - 0.003 и Zn - 0.0002. За формирање плазме коришћен је аргон који се јонизује под дејством електромагнетног поља које је формирала електрична струја. Енергија за ексцитацију атома из узорка потиче од велике густине електрона у плазми, као и њене температуре која достиже 10000 K (9726.9 °C).

Узорци у течном и гасовитом стању могу директно да се уводе у апарат кроз уске цевчице. Раствори се преводе у аеросол и у таквом стању се уводе у канал за аеросол. Квалитет аналитичког процеса контролисан је анализом референтних материјала (NIST-1643, RS – за воду и GBW10015 Spinach – за ткива).

На крају овог поглавља кандидат је описао методе статистичке обраде добијених резултата. Добијени резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка. Дистрибуција свих варијабли анализирана је Колмогоров-Смирнов тестом нормалности дистрибуције. За анализу утицаја сезоне и локалитета коришћена је двофакторска анализа варијансе (ANOVA), а за утврђивање разлика између група коришћен је Фишеров пост хок тест. За најмањи степен значајности узета је вредност $p < 0.05$. Канонијском дискриминационом анализом за свако ткиво утврђен је степен диференцираности између врста у оба испитивана периода. Статистичка обрада резултата концентрације метала анализирана је Студентовим t-тестом. За најмањи степен значајности узета је вредност $p < 0.05$.

Приказ **РЕЗУЛТАТА** организован је у складу са постављеним циљевима. Резултати експеримената приказани су табеларно и графички са објашњењима у легендама. Прво су приказани резултати који се односе на просечне дужине и телесне масе јединки, а затим су приказани кондициони фактор и хепатосоматски индекс. Даље су дате концентрације хемоглобина у крви, као и концентрације укупних протеина у јетри, бубрегу, мишићу и масном ткиву. Ове вредности су касније коришћене за прерачунавање специфичне активности ензима у крви и ткивима змија. У следећем поглављу су илустративно приказани електрофоретски профили протеина у испитиваним ткивима змија. У даљем тексту су приказане активности ензимских и концентрације неензимских компоненти система заштите од оксидационих оштећења у крви и ткивима. Следе резултати везани за експресију ензима фазе I биотрансформације (CYP1A), као и за активност ензима фазе II биотрансформације (GST) у плазми и ткивима. Даље су приказани резултати биохемијског показатеља оксидационог оштећења липида - липидне пероксидације у крви и ткивима, а после тога и активност холинестераза, такође у плазми и ткивима. Следе резултати везани за експресију металотионеина у јетри испитиваних врста змија. Следећу целину чини канонијска дискриминациона анализа којом се описује груписање резултата по врстама и локалитетима. Последњу целину овог поглавља чине подаци о концентрацијама метала у води и њиховој биоакумулацији у ткивима јетре и мишића. Ови подаци су приказани табеларно за обе сезоне и обе испитиване врсте.

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

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

Последњих деценија предложени су бројни екотоксиколошки биомаркери. Биомаркери који се заснивају на праћењу прооксидационо/антиоксидационог дисбаланса, као и последица поремећене редокс равнотеже представљају ране сигнале упозорења.

Веома корисни биомаркери су промене у антиоксидационој одбрани јер су многи ефекти спољашњих утицаја повезани са оксидационим стресом. Семиакватичне врсте змија имају неке особине које им пружају предност у биомониторинг студијама. Имају мали радијус кретања и користе и водене и копнене ресурсе. Налазе се на врху ланца исхране и представљају добар модел за праћење биоакумулације токсичних материја. Постоје литературни подаци о истраживањима биоакумулације метала у ткивима неких врста змија, али веза биоакумулације са биомаркерима оксидационог стреса је веома мало проучавана. Хематолошке студије код змија су ограничене на морфолошке студије крвних ћелија и основне биохемијске анализе, док не постоје детаљне студије о антиоксидационом статусу. Проучавање оксидационог стреса у крви има посебан значај због присуства високих концентрација кисеоника, хемоглобина и полинезасићених масних киселина које су подложне оксидационим оштећењима. Животиње које хибернирају имају развијене адаптивне механизме који им омогућавају да при изласку из хипометаболичког стања не дође до неповратног оштећења ћелијских структура и да се успостави нормална ћелијска функција. За разлику од њих, исхемија и реперфузија код нехибернатора доводи до значајних патолошких стања. Већина аутора међу ензимским компонентама антиоксидационе заштите нарочито идваја SOD, CAT и ензим фазе II биотрансформације GST. SOD и CAT представљају прву линију одбране од слободних радикала. SOD је поред сезонских утицаја подложна и утицају бројних ксенобиотика што је потврђено у многим студијама. Што се тиче ензима CAT, често је њена активност индукована на загађеним локалитетима, што указује на повећање нивоа ендогеног водоник пероксида. У јетри врста које су проучаване у овој докторској дисертацији, активност ензима такође показује тенденцију повећања активности у Панчевачком риту, осим код белоушке после хибернације. GSH-Px у јетри и бубрегу обе врсте, као и у мишићу и масном ткиву рибарице такође показује тенденцију повећања активности у Панчевачком риту. Излазак из хибернације прати повећана продукција слободних радикала кисеоника услед повећаног нивоа аеробног метаболизма. Зато је повећање активности ензима антиоксидационе заштите ефикасна адаптивна стратегија у борби против слободних радикала кисеоника. У више студија су описане сезонске варијације у активности GR. Међутим, у нашим истраживањима не може се уочити јединствени сезонски образац промене активности овог ензима, јер његова активност варира у зависности од испитиваног ткива или врсте. Ензим фазе II биотрансформације GST је предложен и широко коришћен као биомаркер присуства потенцијално штетних ксенобиотика код водених организама. Промене активности овог ензима директно одражавају метаболичке поремећаје и оштећења ћелија код различитих врста риба. Код свих пойкилотермних организама промене активности антиоксидационих ензима су такође условљене и променама амбијенталне температуре и самим тим и променама у метаболичким захтевима организма. Хомеостаза SH група је веома важан фактор за одржавање редокс равнотеже у ћелији. Промена у концентрацији слободних сулфхидрилних група може да утиче на структуру и функцију протеина, а самим тим и активност ензима система заштите од оксидационих оштећења. Липидна пероксидација је углавном повезана са смањеном активношћу селен-зависног ензима GSH-Px у јетри и масном ткиву. MT представљају фамилију протеина веома мале молекулске масе чија је

основна улога у ћелији везивање и детоксикација метала. Индукција металотионеина не указује нужно на тренутно присуство метала, већ да је организам у току свог живота дошао у контакт са повећаном концентрацијом неког метала. Према резултатима ове докторске дисертације, код белоушке у оба испитивана периода, као и код рибарице у периоду после хибернације, регистрована је повећана експресија металотионеина у јетри јединки са Обедске баре. Степен акумулације метала у ткивима зависи од фактора спољашње средине, као што су количине растворених метала, физичко-хемијских карактеристика, интеракције између метала, количине метала у храни, сезонских ефеката и унутрашњих фактора, као што су индивидуална варијабилност, старост, фаза развоја, величина, пол, итд. Код процеса биоакумулације и биомагнификације, концентрације елемената веће су у организмима који се налазе на врху ланца исхране. Змије су, као предатори веома погодни објекти у испитивањима биоакумулације и биомагнификације у ланцу исхране. Сезонске варијације у биоакумулацији метала могу да настану због различитог физиолошког статуса животиња (гаметогенеза, раст, парење, интензиван унос хране, итд.), што такође утиче и на флукуације ензимске активности. Код неких других врста организама, као што су дагње, постоји мања тенденција биоакумулације у топлијем периоду године, што може да се доведе у везу са репродуктивним циклусом. На основу добијених резултата, може се претпоставити да је главни узрок варијабилности у акумулацији метала између две испитиване врсте првенствено њихова различита исхрана. Степен индукције или инхибиције одређеног биомаркера зависи од врсте, пола, нутритивног статуса, фазе репродуктивног циклуса, дужине излагања металима, њихове концентрације, итд. Зато је у природним условима у којима су организми изложени мешавини метала (али и других супстанци), веома тешко утврдити специфичан утицај сваког метала, као и одговор биомаркера. Ситуација се додатно компликује кумулативним ефектом, па често само можемо да закључимо да је организам дошао у контакт са металом, али не и када и колико дуго је контакт трајао.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно и концизно се износе закључци добијени анализирањем експерименталних резултата. Комисија истиче само неке од њих. Постоји јасан сезонски утицај на активност Uк SOD и CuZn SOD, док не постоји разлика у активности између локалитета у јетри код обе врсте. Активност CAT у јетри, бубрегу и мишићу *N. tessellata* из Панчевачког рита била је већа у периоду после хибернације. На овом локалитету активност CAT је била већа у односу на Обедску бару у јетри и мишићу *N. natrix* пре хибернације. Активност GSH-Px била је већа у периоду после хибернације у јетри обе врсте и са оба локалитета. Смањење активности GSH-Px добијена је у крви обе врсте из Панчевачког рита. Не може се уочити јединствен образац сезонске промене активности GR која значајно варира у зависности од испитиване врсте и локалитета. Добијене су значајно мање концентрације SH група у свим ткивима *N. natrix* пре хибернације и *N. tessellata* после хибернације. Повећан ниво липидне пероксидације добијен је у крви *N. tessellata* из Панчевачког рита после хибернације, бубрегу пре хибернације и масном ткиву у обе сезоне. Код *N. natrix* смањење липидне пероксидације је добијено у крви, јетри и масном ткиву у Панчевачком рити. Ниво експресије CYP1A у јетри *N. tessellata* био је значајно већи на Обедској бари. Активност GST показује

различити образац промене активности у зависности од врсте, као и испитиване сезоне. Активност ChE у ткивима обе врсте из Панчевачког рита је била углавном инхибирана, међутим изванредан степен инхибиције је добијен и код јединки са Обедске баре. У јетри белоушке у обе сезоне, као и код рибарице после хибернације повећан је ниво експресије металотионеина у Обедској бари. У периоду пре хибернације у јетри белоушке концентрација мангана била је већа у јединкама са Обедске баре, док је концентрација алуминијума била већа у јетри јединки из Панчевачког рита. У јетри рибарице пре хибернације концентрације гвожђа, молибдена и цинка биле су веће на Обедској бари. Концентрације бакра, мангана, молибдена и цинка у јетри рибарице биле су веће на Обедској бари. Канонијском дискриминационом анализом показане се разлике испитиваних параметара између врста. Кандидат је на крају дао општи закључак и констатовао да приказана истраживања представљају прву детаљну студију о испитиваним биомаркерима и концентрацији метала у одабраним ткивима белоушке и рибарице са Обедске баре и Панчевачког рита што представља добру полазну основу за даља истраживања у области екофизиологије и екотоксикологије змија.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** дата је листа од 223 библиографске јединице које су коришћене током израде ове докторске дисертације. Комисија може да констатује да је коришћена релевантна литература која обухвата како ране радове из ове области на змијама, сродним врстама гмизаваца и другим врстама животиња, тако и најновије литературне податке.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја ($M_{23} = 3$ поена):

1. **Gavrić, J.P.**, Prokić, M.D., Anđelković, M.Z., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Borković-Mitić, S.S., Radovanović, T.B., Tomović, Lj.M., Pavlović, S.Z. and Saičić, Z.S. (2014). Effect of metals on blood oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in dice snake (*Natrix tessellata*) from Serbia. Archives of Biological Sciences, Belgrade, 67, 303-315.
2. **Gavrić, J.**, Prokić, M., Despotović, S., Gavrilović, B., Radovanović, T., Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Saičić, Z. (2015). Biomarkers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the blood of Grass snake (*Natrix natrix* L.) during prehibernation and posthibernation periods. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58, 443-453.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Јелене П. Гаврић, истраживача сарадника под насловом „Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обедске баре и Панчевачког рита“ представља оригиналан научни рад са јасно 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 приказани и 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 подаци о упоредном прегледу утицаја локалитета и сезоне на биомаркере оксидационог стреса, ензиме фазе I и фазе II биотрансформације, параметар неуротоксичности, као и на биохемијске последице изложености сезонским и антропогеним утицајима код две аутохтоне врсте змија белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*). Анализа концентрације метала у испитиваним ткивима показује различит степен акумулације у зависности од врсте, сезоне и локалитета и представља прве податке те врсте на нашим просторима.

Истраживања спроведена у овој докторској дисертацији показала су да биомаркери оксидационог стреса, биотрансформације и неуротоксичности у испитиваним врстама змија испољавају варијације у зависности од испитиване врсте, сезоне, испитиваног локалитета, а самим тим и композиције метала у животној средини. Утврђен је различит степен биоакумулације метала у испитиваним ткивима који не корелира у потпуности са концентрацијом метала измереном у животној средини, што је резултат индивидуалне варијабилности и утицаја сложених еколошких фактора. Показано је да метали присутни у ћелијама могу да модулирају интензитет и смер промена испитиваних биомаркера. Обзиром да се ради о првој детаљној студији истраживаних биомаркера код одабраних врста змија, резултати ове докторске дисертације представљају добру полазну основу за даља истраживања у области екофизиологије и екотоксикологије змија.

Јелена П. Гаврић, истраживач сарадник је током израде ове докторске дисертације показала висок степен компетентности, као и смисао за комплексне истраживачке приступе. Кандидат је препознатљив у својој области истраживања и до сада, заједно са радовима који су проистекли директно из ове докторске дисертације, има 12 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 Јелене П. Гаврић, истраживача сарадника под насловом **“Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обедске баре и Панчевачког рита“**.

КОМИСИЈА:

Др Слађан Павловић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Др Синиша Ђурашевић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Небојша Јаснић, доцент
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Зорица С. Саичић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Др Љиљана Томовић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

У Београду, 03.06.2015. године