

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ КАНДИДАТА ТАТЈАНЕ НИКОЛИЋ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовано комисију</p> <p>На 27. седници одржаној 06.04.2017. године, Наставно-научно веће Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду је именовало Комисију за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Татјане Николић.</p>
<p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>др Неда Мимица-Дукић, редовни професор, ужа научна област Биохемија, датум избора: 01.08.2003. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; председник комисије</p> <p>др Јелена Пураћ, ванредни професор, ужа научна област Молекуларна биологија, датум избора: 01.07.2015. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; ментор</p> <p>др Данијела Којић, ванредни професор, ужа научна област Биохемија, датум избора: 01.07.2015. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; члан</p> <p>др Анђелка Ћелић, доцент, ужа научна област Молекуларна биологија, датум избора: 17.07.2013. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; члан</p> <p>др Душко Благојевић, научни саветник, ужа научна област Физиологија, датум избора: 20.07.2007. године, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”; члан</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Татјана, Владимир, Николић</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 21.11.1987, Нови Сад, Република Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p>

Природно-математички факултет, Мастер биолог-молекуларни биолог

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија

2011. година, Докторске академске студије биохемије

5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -

6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

„Молекуларне основе одговора медоносне пчеле (*Apis mellifera*, L.) на стрес изазван јонима тешких метала”

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација Татјане Николић је написана на српском језику, латиничним писмом, са кључном документацијском информацијом на српском и енглеском језику. Текст је написан на 139 страна А4 формата и садржи 31 слику, 11 табела и 221 литературни навод. Дисертација је организована у девет поглавља: Увод - 2 стране, Општи део - 40 страна, Циљ - 2 стране, Материјал и методе - 19 страна, Резултати - 35 страна, Дискусија - 16 страна, Закључак - 3 стране, Литература - 18 страна, Прилози - 4 стране. На почетку дисертације налази се предговор, списак скраћеница, списак илустрација, списак табела и садржај, а након литературних навода следи биографија кандидаткиње и кључна документацијска информација.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасно дефинисан, одражава суштину испитиване проблематике и директно указује на циљ испитивања.

У **Уводу** је укратко описан предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације.

Општи део је подељен на три потпоглавља. У првом потпоглављу је описана таксономија и биологија медоносне пчеле, као и значај истраживања ове врсте. У другом потпоглављу је објашњен појам тешких метала, и механизми њихове токсичности на живе системе. Механизми токсичности појединих тешких метала су детаљније описани. Поред тога, описани су и начини на које медоносне пчеле долазе у контакт са тешким металима из животне средине. У трећем потпоглављу дат је приказ ћелијских механизма који су укључени у одговор на стрес. У овом делу акценат је стављен на ћелијски одговор на оксидативни стрес и металотионеин, који су и предмет истраживања ове дисертације. Описане су реактивне кисеоничне врсте, механизми антиоксидативне заштите и оксидативна оштећења биомолекула у присуству оксидативног стреса. Представљена је структура и функција металотионеина, као и регулација његове експресије. На крају овог потпоглавља, дат је преглед ћелијских механизма одговора на стрес код медоносне пчеле, где је истакнуто да су оне подложне стресу због мањег броја гена за детоксикацију.

У оквиру увода и општег дела, кандидаткиња је успешно представила значај истраживања

и досадашња сазнања о проблематици докторске дисертације.

У поглављу **Циљ** су јасно дефинисане три фазе истраживања и дефинисан циљ сваке од фаза. У првој фази анализирани су пчеле, мед и перга са три локалитета у Републици Србији са различитим степеном урбанизације и индустријализације како би се проценила изложеност пчела токсичним металима из животне средине, мерењем њихове концентрације у пчелама, перги и меду, као и да се одреде разлике у генској експресији и активности антиоксидативних ензима између пчела са изабраних локалитета. У другој фази рађени су лабораторијски тестови у којима је циљ био да се у контролисаним условима анализира акутни утицај присуства јона тешких метала (бабра, олова и кадмијума) у исхрани пчела на генску експресију и активност антиоксидативних ензима. У трећој фази циљ је био да се коришћењем биоинформатичких алата идентификује протеин који би по својим особинама могао да се сврста у групу металотионеина медоносне пчеле, који до сада није описан, опише структура протеина и гена који га кодира и испита његова функција у заштити од токсичности тешких метала.

Наведени циљеви су у складу са циљевима наведеним приликом пријаве докторске дисертације.

У поглављу **Материјал и методе** су прво описане поставке теренских и лабораторијских тестова, начин формирања експерименталних група и начин сакупљања узорак. Затим су детаљно описане примењене методе коришћене за:

- одређивање концентрације метала у пчелама и пчелињим производима,
- мерење релативне генске експресије,
- мерење специфичне активности антиоксидативних ензима и одређивање редокс статуса,
- идентификацију и биоинформатичку анализу гена за металотионеин,
- клонирање гена за металотионеин, експресију рекомбинантног протеина и анализу његове функције.

Комисија оцењује да су материјали и методе адекватни и савремени. Такође, веома су прецизно и систематично наведени и омогућавају поновљивост анализа.

Поглавље **Резултати** је подељено на три потпоглавља која прате фазе истраживања наведене у поглављу Циљ: резултати теренских тестова, резултати лабораторијских тестова и анализа металотионеина. Резултати су представљени табеларно или графички, и статистички су адекватно обрађени.

У првом потпоглављу приказани су резултати теренских тестова. Концентрација метала у пчелама, перги и меду се статистички разликовала између узорак са различитих локалитета. Резултати мерења активности антиоксидативних ензима: супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион *S*-трансферазе и експресије гена за ове ензиме су показали да постоје значајне разлике између локација са различитим антропогеним утицајем.

У другом потпоглављу представљени су резултати лабораторијских тестова. Приказани су подаци о морталитету и уносу хране из којих се може видети да су коришћене концентрације метала (бабра, кадмијума и олова) у периоду од 48 сати узроковале морталитет мање од 50% пчела. Активност антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион *S*-трансферазе) као и параметри редокс статуса (концентрација глутатиона, сулфхидрилних група протеина и малондиалдехида) у већини експерименталних група нису били значајно промењени. Анализа гена за антиоксидативне ензиме је показала да постоје значајне разлике у експресији код пчела третираних различитим металима и у већини случајева експресија је била дозно зависна од

концентрације метала. Третман бакром и кадмијумом је довео до повећане експресије готово свих гена, док је олово изазвало повећану експресију једино оба гена за супероксид дисмутазу.

Треће потпоглавље је обухватило резултате анализе металотионеина. Приказане су генска, cDNK и протеинска секвенца потенцијалног металотионеина медоносне пчеле, као и предвиђена места за везивање транскрипционих фактора у промоторском региону гена и преглед транскрипционих фактора који потенцијално могу да утичу на експресију металотионеина. Такође је приказана филогенетска анализа протеинских секвенци 34 металотионеина, од којих су 6 новоидентификовани металотионеини код врста из реда *Hymenoptera*. За испитивање особина предвиђеног металотионеина медоносне пчеле урађено је молекуларно моделовање и анализирани су потенцијални начини за везивање прелазних метала. Даље је приказана експресија рекомбинантног протеина и резултати који су показали да бактерије *E. coli* које експресују овај протеин поседују повећану толеранцију на присуство тешких метала. Измерена експресија гена за металотионеин код медоносне пчеле након излагања бакру, олову и кадмијуму у контролисаним условима показала је да се експресија овог гена повећава у дозно зависном маниру.

Комисија сматра да су резултати истраживања прегледно приказани и адекватно анализирани.

У поглављу **Дискусија** дата је анализа и интерпретација резултата. Дискусија је подељена у три потпоглавља како би пратила фазе истраживања и приказане резултате. Најпре су анализирани резултати теренских тестова. Прокоментарисани су резултати анализе садржаја метала у пчелама, перги и меду и закључено је да су односи концентрација различитих метала у пчелама и перги слични, док је садржај метала у меду много мањи. Резултати мерења активности и експресије антиоксидативних ензима су прокоментарисани и упоређени са резултатима сличних истраживања и закључено је да животна средина може имати различит утицај на ове параметре, што зависи од количине, али и комбинације присутних тешких метала. Истакнуто је да су пчеле из индустријске области (Зајаче) потенцијално изложене оксидативном стресу услед инхибиције активности ензима каталазе. У другом делу дискусије анализирани су резултати лабораторијских тестова, у којима је утицај бакра, кадмијума и олова процењен у контролисаним условима. С обзиром да није било разлике у активности антиоксидативних ензима између експерименталних група, сматра се да је 48 сати кратак период да би се уочиле такве промене. Резултати експресије гена у присуству различитих концентрација метала су показали дозну зависност, и упоређени су са резултатима добијених код других врста. Олово је изазвало повећање концентрације глутатиона и сулфхидрилних група, и закључено је да неензимска антиоксидативна заштита може да има улогу при интоксикацији овим металом. У трећем делу дискусије наведени су резултати биоинформатичке анализе потенцијалног металотионеина медоносне пчеле из којих се види да је у питању мали протеин богат цистеином и да у промоторском региону гена постоје места за везивање великог броја транскрипционих фактора, што говори о могућој индукцији овог гена разним стимулусима. Молекуларно моделовање је показало да овај протеин поседује места за везивање прелазних метала и да има афинитет за везивање цинка, кадмијума и бакра. Ови подаци су у складу са експерименталним резултатима где је показано да експресија овог протеина повећава толеранцију бактерија на присуство бакра, кадмијума и олова, као и да је експресија гена за металотионеин код медоносне пчеле повећана у присуству ових метала и повећава се у дозно зависном маниру. Добијени резултати указују да је овај протеин заиста металотионеин који има улогу у хомеостазии и детоксикацији металних јона.

Комисија сматра да је дискусија опсежно написана. Резултати су детаљно анализирани и продискутовани заједно са актуелним литературним подацима, а закључци су добро

аргументовани.

У поглављу **Закључак** су истакнути закључци који произилазе из добијених резултата и дискусије.

На основу наведеног, Комисија закључује да су остварени планирани циљеви истраживања у оквиру докторске дисертације.

Литература цитирана у оквиру докторске дисертације (221 референца) је савремена, адекватно одабрана и указује на значај и актуелност остварених истраживања. Библиографија је навођена на одговарајући начин.

У поглављу **Прилог** дата је табела са местима за везивање транскрипционих фактора који су пронађени помоћу неколико програма.

Комисија сматра да је прилог информативан и да на адекватан начин употпуњује дисертацију.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Резултати ове докторске дисертације су до сада објављени у два рада у часописима међународног значаја, једном саопштењу на међународном скупу штампаном у изводу и једном саопштењу на националном скупу штампаном у изводу.

Категорија M21, ИФ=3,698

Nikolić T.V., Kojić D., Orčić S., Batinić D., Vukašinić E., Blagojević D.P., Purać J. (2016) The impact of sublethal concentrations of Cu, Pb and Cd on honey bee redox status, superoxide dismutase and catalase in laboratory conditions. *Chemosphere* 164: 98-105.

Категорија M22, ИФ=1,357

Nikolić T.V., Purać J., Orčić S., Kojić D., Vujanović D., Stanimirović Z., Gržetić I., Ilijević K., Šikoparija B., Blagojević D.P. (2015) Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 90(4):181-194.

Категорија M34

Nikolić T., Orčić S., Kojić D., Popović Ž., Plavša N., Purać J. (2015) Glutathione and protein thiol groups concentrations in honey bee after oral exposure to lead. *III simpozijum biologa i ekologe Republike Srpske, Zbornik Sažetaka*: 121-121.

Категорија M64

Nikolić T., Orčić S., Kojić D., Plavša N., Šikoparija B., Popović Ž.D., Purać J. (2016) Superoxide dismutase and catalase genes expression in honey bee as a potential biomarker for lead (Pb) pollution. *Ecological crisis: technogenesis and climate change*: 123-123.

VII ZAKЉUЧЦИ OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу теренских истраживања могу се извести следећи закључци:

- концентрација тешких метала у пчелама и перги се разликује у зависности од степена урбанизације и индустријализације животне средине, а перга може да се користи за процену изложености медоносне пчеле (*Apis mellifera*, L.) тешким металима;
- садржај метала у меду је мањи у односу на пергу и пчеле;
- активност антиоксидативних ензима се мења под утицајем услова животне средине: ниво експресије гена и активност супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион S-трансферазе су се разликовали између пчела радилица са различитих локалитета;
- повећана активност супероксид дисмутазе и истовремено смањена активност каталазе говори о могућем оксидативном стресу у пчелама радилицама из Зајаче изазваном великим концентрацијама тешких метала, нарочито олова.

Резултати лабораторијских тестова су показали да:

- излагање пчела бакру, олову и кадмијуму у трајању од 48 сати није узроковало промене у активности супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион S-трансферазе у односу на контролну групу;
- концентрација малондиалдехида није била промењена, што упућује на закључак да није дошло до оксидативних оштећења биомолекула;
- третман оловом је повећао концентрацију глутатиона и сулфхидрилних група протеина, што говори о томе да хелација олова може да буде први механизам одбране од токсичних ефеката овог метала;
- анализа гена за супероксид дисмутазу (*Sod1* и *Sod2*), каталазу (*Cat*) и глутатион S-трансферазу (*Gstd1*, *Gsts1* и *Gstmic1*) је показала повећање експресије код пчела третираних бакром и кадмијумом у различитим концентрацијама; у већини случајева експресија је била дозно зависна од концентрације метала.

Идентификација и анализа металотионеина медоносне пчеле је довела до следећих сазнања:

- пчеле поседују један ген за металотионеин, који кодира мали протеин по структури сличан металотионеинима других врста и поседује регионе богате цистеином за које могу да се вежу јони метала, пре свега цинк, кадмијум и бакар;
- промоторски регион овог гена, поред респонсивног елемента за метале, садржи и велики број различитих респонсивних елемената за везивање транскрипционих фактора који су укључени у општи одговор на стрес, оксидативни стрес, хипоксију, биотрансформацију, регулацију ћелијског раста и диференцијације, што доказује да металотионеин медоносне пчеле може бити индукован разним стимулусима;
- индукција генске експресије гена за металотионеин (*AmMT*) код медоносне пчеле након излагања металима и повећана толеранција бактерија које експресују рекомбинантни металотионеин на метале је потврдила да металотионеин медоносне пчеле има улогу у хомеостазии биоелемената и детоксикацији потенцијално токсичних метала.

Добијени резултати представљају основу за будућа истраживања утицаја јона тешких метала на медоносну пчелу (*Apis mellifera*, L.) и представљају важан корак у свеобухватној процени утицаја стресогених фактора из животне средине на пчеле.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

На основу прегледа докторске дисертације, Комисија сматра да је она јасно структурирана. Резултати истраживања су прегледно представљени и правилно анализирани, детаљно дискутовани и упоређени са резултатима других аутора. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговор на постављене циљеве истраживања. Комисија даје позитивну оцену приказа и тумачења резултата истраживања.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Да, Комисија оцењује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Да, дисертација садржи све битне елементе неопходне за овакву врсту рада: дефинисану тему истраживања, преглед постојећих истраживања у области, детаљан приказ експерименталних метода и техника, јасан и прегледан приказ резултата и њихову дискусију коришћењем доступне литературе. Закључци су правилно изведени из добијених резултата.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Резултати ове докторске дисертације пружају нове податке о утицају загађења тешким металима на медоносне пчеле. Иако је ова врста од изузетног економског и еколошког значаја, истраживања о утицају еколошких фактора, а посебно повећане концентрације тешких метала на метаболизам пчела су спорадична. Због тога истраживања спроведена у оквиру ове дисертације пружају оригиналан допринос науци, посебно са аспекта бољег разумевања молекуларних и биохемијских основа одговора медоносне пчеле на стрес. Нарочито је значајна идентификација металотионеина који до сада није описан код ове врсте, јер поред тога што даје увид у још један аспект одговора на стрес, може и да употпуни слику о еволуцији и структури овог протеина, при поређењу са металотионеинима других врста организама.

Део добијених резултата је публикован у два научна рада категорије M21 и M22 што указује на квалитет и оригиналност спроведених истраживања.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

По мишљењу Комисије, ова докторска дисертација нема значајних недостатака.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација под називом „Молекуларне основе одговора медоносне пчеле (*Apis mellifera*, L.) на стрес изазван јонима тешких метала” **прихвати**, а кандидату Татјани Николић **одобри одбрана**.

У Новом Саду, 24.04.2017.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Неда Мимица-Дукић, редовни професор,
Природно-математички факултет,
Универзитет у Новом Саду, председник

др Јелена Пураћ, ванредни професор,
Природно-математички факултет,
Универзитет у Новом Саду, ментор

др Данијела Којић, ванредни професор,
Природно-математички факултет,
Универзитет у Новом Саду, члан

др Анђелка Ћелић, доцент,
Природно-математички факултет,
Универзитет у Новом Саду, члан

др Душко Благојевић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша
Станковић”, Универзитет у Београду, члан