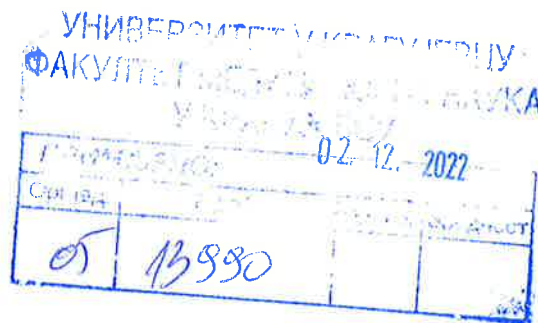


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 12.07.2022. године, одлуком број: IV-03-517/11 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „*In vivo* и *in vitro* испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица“, кандидата Сандре Николић, у следећем саставу:

1. др **Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. др **Оливера Милошевић Ђорђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Медицинска генетика*, члан;
3. др **Срђан Пешић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Сандре Николић и подноси Наставно-научном већу следећи

2. Извештај комисије о оцени и одбрани завршене докторске дисертације

2.1. Опис докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Сандре Николић под називом „*In vivo* и *in vitro* испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица“, урађена је под менторством проф. др Биљане Љујић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и доц. др Марине Газдић Јанковић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је на јасан и прецизан начин и цитирајући релевантну литературу изложила актуелни тренд производње и употребе пластике у свакодневном животу, као и глобални проблем загађења животне средине отпадном пластиком. Такође, описана је хемијска структура и биоразградња полистирена, начини интрацелуларног уношења полистиренских микро и нано-честица (енгл. *polystyrene microparticles and nanoparticles*, PS-MP/NP), као и њихов штетни утицај на здравље људи.

Циљеви и хипотезе истраживања јасно су изложени и дефинисани у складу са одобреним приликом пријаве тезе. Циљ ове студије био је да се испитају цитотоксично и генотоксично дејство PS-MP/NP *in vitro*, као и пенетрација, дистрибуција и

акумулација *per os* унетих PS-MP/NP у ткивима миша, и њихов утицај на понашање експерименталних животиња.

Материјал и методе рада су прецизно формулисани и подударају се са одобреним приликом пријаве тезе. Истраживање је осмишљено као експериментална студија на ћелијама *in vitro* и на животињама *in vivo*. У истраживању су коришћене честице полистирена величине 40 и 200 nm. Испитивање ефеката PS-MP/NP *in vitro* спроведено је на лимфоцитима изолованим из периферне крви C57BL/6 мишева, моноклеарним ћелијама изолованим из слезине C57BL/6 мишева, лимфоцитима изолованим из периферне крви здравих људи, ћелијској линији хуманих феталних фибробласта плућа (MRC-5) и ћелијској линији хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонталног лигамента (MSC-PDL). Мишеви соја C57BL/6, мушког и женског пола, старости од 8 до 10 недеља, третирани су *per os* флуоресцентно обележеним PS-MP/NP величине 40nm и 200 nm, раствореним у води у две концентрације: ниска доза (0,01 mg / по мишу / дневно) или висока доза (0,1 mg / по мишу / дневно), једном дневно током 5 недеља. Након третмана, мишеви су жртвовани, а узорци јетре, црева, срца, бубрега, плућа, мозга, слезине, тестиса и јајника су анализирани конфокалном микроскопијом. Узорци серума су коришћени за мерење концентрације укупног тестостерона. Цитотоксичност PS-MP/NP испитана је мерењем вијабилности моноклеара изолованих из слезине мишева третираних PS партикулама МТТ тестом и RTCA анализом. Апоптотска смрт ћелија слезине мишева изазвана PS честицама квантификована је двоструким бојењем са *Annexin V*/пропидијум јодидом, док је за *in situ* детекцију фрагментације ДНК у ткиву слезине коришћен TUNEL есеј. Генотоксичност честица полистирена је испитана Комет тестом. Ради процене анксиозности и депресивности животиња које су *per os* третиране PS-MP/NP раствором у води спроведена су бихевиорална тестирања. Релативна експресија гена код женки и мужјака мишева након пероралног уноса PS-MP/NP анализирана је квантитативном реакцијом ланчане полимеризације у реалном времену (qRT-PCR).

Резултати истраживања су систематично приказани табелама (укупно 8) и фигурама (укупно 24). На основу изнетих резултата закључује се да PS-MP/NP дате *per os* пролазе кроз дигестивни систем сисара, акумулирају се у различитим ткивима, утичу на хормонски и инфламаторни статус, као и на понашање третираних експерименталних животиња.

У поглављу „Дискусија“ детаљно су објашњени резултати истраживања, коментарисањем у односу на резултате претходно објављених истраживања.

2.2. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Значајно повећање количине отпадне пластике која доприноси загађењу животне средине је све већи глобални проблем и изазива забринутост за здравље људи. Еколошки утицај индустријски произведене (примарна пластика) или пластике микрометарске (енгл. *microparticles*, MP; опсег величине 0,001–5 nm) и нанометарске величине (енгл. *nanoparticles*, NP; пречник <100 nm) настале деградацијом под утицајем биолошких, физичких или хемијских фактора (секундарна пластика) последњих година

расте. Полистирен (енгл. *polystyrene*, PS) је пластика са најширом употребом у свакодневном животу. PS настаје као резултат полимеризације стирена, док се стирен добија каталитичком дехидрогенизацијом етилбензена. PS има штетан утицај на слатководни екосистем, међутим, честице пластике из водене средине могу лако доћи до копнених животиња кроз ланац исхране и имати негативан утицај на опстанак ових организама. Недавне студије су показале да различите врсте наночестица могу да прођу мукозну баријеру и уђу у циркулацију, што доводи до директног оштећења ћелија и штетних системских ефеката. У условима *in vitro*, нанопластика се брзо интернализује путем различитих механизма. Њена акумулација у интрацелуларним везикулама резултира стварањем високих нивоа слободних радикала који се сматрају главним узрочником потенцијалне токсичности PS-MP/NP. Повећано загађење хране, воде и ваздуха као и контакт са нанопластиком за последицу може имати поремећај у ембрионалном развоју, настанак генетских и имунолошких болести код људи путем механизма који још нису потпуно познати.

Имајући у виду наведене чињенице, циљ овог истраживања је био да се испита дејство полистиренских микро- и нанопартикула на ћелије *in vitro*, као и њихов утицај на различите органске системе *in vivo* применом мишјег модела.

2.3. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „*Medline*“ и „*KoBSON*“, уз коришћење одговарајућих кључних речи: „*polystyrene*“, „*microparticles*“, „*nanoparticles*“, „*mice*“, „*accumulation*“ и „*behavior*“ нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Сандре Николић под називом „*In vivo* и *in vitro* испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица“ представља резултат оригиналног научног рада.

2.4. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Дипломирани хемичар за истраживање и развој Сандра Николић рођена је 14.04.1972. године у Крагујевцу. Завршила је основну школу „Милутин и Драгиња Тодоровић“ у Крагујевцу, средњу медицинску школу-општи смер „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу. На Природно математичком факултету Универзитета у Крагујевцу- одсек хемија, дипломирала је 09.04.2009. године и стекла звање дипломирани хемичар за истраживање и развој. Докторске академске студије је уписала 2009. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија. Усмени докторски испит је положила 28.01.2014. године са оценом 8. Од 21.10.2009. године је запослена на Факултету медицинских наука као виши лаборант на Катедри за генетику. На Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу завршила је обуку за Саветника за хемикалије. Укључена је у научно истраживачки рад на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

Кандидат је аутор више оригиналних научних радова и први аутор у једном раду објављеном у часопису индексираним на *SCI* листи. Резултати рада наведени под редним бројем 1 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану докторске дисертације.

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

1. **Nikolic S**, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, Zivanovic M, Seklic D, Milivojević N, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic KM, Stojkovic M, Ljubic B. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environ Pollut.* 2022;305:119206. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119206. **M21**
2. Miloradovic D, Pavlovic D, Jankovic MG, **Nikolic S**, Papic M, Milivojevic N, Stojkovic M, Ljubic B. Human Embryos, Induced Pluripotent Stem Cells, and Organoids: Models to Assess the Effects of Environmental Plastic Pollution. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:709183. doi: 10.3389/fcell.2021.709183. **M21**
3. Postolovic K, Ljubic B, Miletic Kovacevic M, Đorđević S, **Nikolic S**, Zivanovic S, Stanic Z. Optimization, characterization, and evaluation of carrageenan/alginate/poloxamer/curcumin hydrogel film as a functional wound dressing material. *Materials Today Communications.* doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.103528. **M22**

2.5. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Сprovedено истраживање у потпуности је усклађено са пријављеном темом докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија идентични су са одобреним у пријави тезе. Докторска дисертација кандидаткиње Сандре Николић садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви и хипотезе, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Написана је на 64 стране и има 11 табела и 35 фигура. Поглавље Литература садржи 122 цитираних библиографских јединица из иностраних и домаћих стручних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата Сандре Николић под називом „*In vivo* и *in vitro* испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица“ по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.6. Научни резултати докторске дисертације

- Полистиренске честице имају способност продирања и акумулације у ткивима миша. PS-MP/NP се акумулирају у јејунуму, црвеној и белој пулпи слезине, тестисима, као и у сензорним ћелијама унутрашњег уха.
- PS-MP/NP имају цитотоксични ефекат који зависи од примењене концентрације и трајања третмана. Већа концентрација (0,1 mg/ml) испитиваних PS честица

(величине 200nm и 40nm) има израженије токсично дејство на ћелије слезине, у поређењу са мањом концентрацијом (0,01 mg/ml). Такође, третман полистиренском пластиком у трајању од 72 сата, има израженији цитотоксични ефекат у односу на третман у трајању од 24 часа.

- PS-MP/NP изазивају апоптотску смрт ћелија. Након третмана PS честицама у концентрацији од 0,1 mg/ml, највећи проценат ћелија је у раној фази апоптозе, док је након третмана у концентрацији од 0,01 mg/ml највећи проценат ћелија у касној апоптози.
- PS-MP/MP изазивају фрагментацију ДНК. Обе концентрације PS-MP/NP (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml) значајно повећавају индекс генетичког оштећења у ћелијама сисара.
- Након уласка у ћелије сисара, PS честице се депонују у ендозомским везикулама, што додатно расветљава механизам њиховог генотоксичног и цитотоксичног деловања.
- Обе примењене концентрације PS честица значајно су утицале на степен анксиозности код мишева. Примена честица полистиренске пластике изазвала је анксиогени одговор код женки мишева. За разлику од женки, мужјаци су показали анксиолитички одговор на третман PS-MP/NP. Полне разлике у понашању третираних мишева узроковане су поремећајем цитокинског и хормонског профила.
- PS-MP/NP се акумулирају око семиниферних тубула, у интерстицијуму тестиса третираних животиња, што узрокује статистички значајно смањење концентрације тестостерона у серуму.
- PS-MP/NP индукују повећање релативне експресије Вах и Nlrp3 код третираних женки као и повећање релативне експресије Bdnf и Tgf- β код третираних мужјака мишева у поређењу са контролама.

2.7. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригиналан допринос разумевању биотоксичности полистиренских микро- и наночестица *in vivo* и *in vitro*. Ова дисертација пружа нова знања о биолошким последицама директног излагања организма вишег трофичког нивоа PS-MP/NP и тиме омогућава боље разумевање утицаја полистиренске пластике на здравље људи.

2.8. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове студије публиковани су као оригинално истраживање у часопису индексираном на SCI листи (категорија M21).

1. **Nikolic S, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, Zivanovic M, Seklic D, Milivojevic N, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic KM, Stojkovic M, Ljujic B.** Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environ Pollut.* 2022;305:119206. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119206. **M21**

ЗАКЉУЧАК

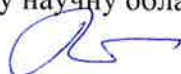
Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Сандре Николић под називом „*In vivo* и *in vitro* испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица“ сматра да је истраживање у оквиру тезе базирано на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Сандре Николић, урађена под менторством проф. др Биљане Љујић и доц. др. Марине Газдић Јанковић представља оригинални научни допринос у испитивању биотоксичности полистиренских микро- и наночестица *in vivo* и *in vitro*.

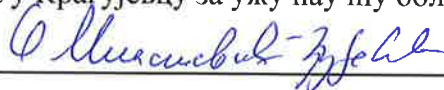
Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „*In vivo* и *in vitro* испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица“ кандидата Сандре Николић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник



др Оливера Милошевић Ђорђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Медицинска генетика*, члан



др Срђан Пешић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, члан



У Крагујевцу, новембар 2022.