

РЕФЕРАТ

О ЗАВРШЕНОЈ ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ КАНДИДАТКИЊЕ ТАЊЕ М.Д. ПАЈИЋ

Веће за студије при Универзитету у Београду, на седници одржаној 15. 4. 2024. године именовало нас је у комисију за преглед и оцену докторске дисертације под насловом „**Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива**“, кандидаткиње Тање М.Д. Пајић (мултидисциплинарне докторске студије при Универзитету, студијски програм: Биофотоника). Након прегледа и анализе приложене докторске дисертације, подносимо Већу следећи извештај:

Основни подаци о кандидату

Тања Пајић, рођена 4. маја 1985. године у Пожаревцу, је завршила интегрисане студије Опште биологије, смер Физиологија животиња, на Биолошком факултету Универзитета у Београду, 2016. године. Дипломирала је на теми „Утицај блокатора анјонских канала на раст спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff, 1925“. Исте године уписала је мултидисциплинарне докторске студије при Универзитету у Београду, студијски програм Биофотоника. Током израде дисертације, кандидаткиња се бавила применом фемтосекундне ласерске нанохирургије ћелијског зида кончастих гљива, као и осликавањем њиховог метаболизма применом различитих модалитета нелинеарне ласерске микроскопије. Од 2018. године је запослена на Биолошком факултету Универзитета у Београду на Катедри за општу физиологију и биофизику. Обучавала је млађе студенте и учествовала у извођењу три мастер рада студената на Катедри за општу физиологију и биофизику. Године 2019. је боравила на тромесечном усавршавању у Центру за молекуларну медицину на Каролинска Институту у Стокхолму (Шведска), где се бавила флуоресцентном корелационом спектроскопијом. Била је ангажована на једном националном пројекту и тренутно је ангажована на једном националном и једном међународном Европском пројекту. У оквиру докторске дисертације публиковала је 2 научна рада у врхунским међународним часописима категорије M21a и M21. Коаутор је још 2 научне публикације у часописима на СЦИ листи и аутор и коаутор 25 саопштења на скуповима међународног значаја и 7 саопштења на скуповима националног значаја.

Библиографија кандидаткиње обухвата следеће научне радове и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Научни радови из докторске дисертације:

1. **Tanja Pajić**, Katarina Stevanović, Nataša V. Todorović, Aleksandar J. Krmpot, Miroslav Živić, Svetlana Savić-Šević, Steva M. Lević, Marina Stanić, Dejan Pantelić, Brana Jelenković i Mihailo D. Rabasović. **In vivo femtosecond laser nanosurgery of the cell wall enabling patch-clamp measurements on filamentous fungi**. *Microsyst Nanoeng* 10, 47 (2024). doi: 10.1038/s41378-024-00664-x. (M21a, I.F. = 7.9)

2. **Pajić Tanja**, Todorović Nataša, Živić Miroslav, Nikolić Stanko N., Rabasović Mihailo D., Clayton Andrew H. A., Krmpot Aleksandar J. **Label-free third harmonic generation imaging and quantification of lipid droplets in live filamentous fungi**. *Sci Rep* 12(1), 18760 (2022). doi: 10.1038/s41598-022-23502-4. (M21, I.F. = 4.997)

Саопштења са међународних скупова штампана у целини из дисертације (M33)

1. **Pajić T**, Todorović N, Stefanović D, Rabasović M, Krmpot A, Živić M. The Effects of Selenite on Filamentous Fungi Lipid Droplets Monitored *in Vivo* Label Free Using Advanced Nonlinear Microscopy Technique. 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, October 26-27, 2021 Kragujevac, Serbia, p. 300-303. doi: 10.46793/ICCB121.300P
2. **Pajić T**, Todorović N, Stefanović D, Rabasović M, Krmpot A, Živić M. The Influence of Selenite on Filamentous Fungi Hypha Morphometry Parameters. 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, October 26-27, 2021 Kragujevac, Serbia, p. 308-311. doi: 10.46793/ICCB121.308P

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу из дисертације (M34)

1. **T. Pajić**, S. Kozakijevic, A.J. Krmpot, M. Zivic, N.V. Todorovic and M.D. Rabasovic. *In vivo* multiphoton imaging of a filamentous fungus *Phycomyces blakesleeanus*: the effect of small ambient temperature increase on mitochondrial morphology and lipid droplets density. IX International School and Conference on Photonics - PHOTONICA2023, August 28 – September 01, 2023, Belgrade, Serbia.
2. **Tanja Pajić**, Nataša V. Todorović, Miroslav Živić, Stanko N. Nikolić, Mihailo D. Rabasović, Andrew H. A. Clayton, Aleksandar J. Krmpot. Third harmonic generation imaging of live fungal cells – quantifying lipid droplets dynamics during nitrogen starvation. 18th European Molecular Imaging Meeting EMIM 2023, March 14 - 17, 2023, Salzburg, Austria.
3. **Tanja Pajić**, Katarina Stevanović, Nataša V. Todorović, Steva Lević, Svetlana Savić Šević, Dejan Pantelić, Miroslav Živić, Mihailo D. Rabasović, Aleksandar J. Krmpot. Laser nano-surgery of fungal cell wall to enable patch clamping. 18th European Molecular Imaging Meeting EMIM 2023, March 14 - 17, 2023, Salzburg, Austria.
4. **Tanja Pajić**, Nataša Todorović, Miroslav Živić, Mihailo Rabasović, Aleksandra Krmpot. Label-Free Third Harmonic Generation Imaging and Quantification of Lipid Droplets in Live Filamentous Fungi. 15th Photonics Workshop, March 13-16, 2022, Kopaonik, Serbia.
5. **Pajić, T.**, Krmpot, A., Todorović, N., Živić, M., Stevanović, K., Rabasović, M. *In vivo* metabolic imaging and micromanipulation of individual filamentous fungus cells using different nonlinear laser scanning microscopy modalities. 20th IUPAB Congress, 45th Annual SBBf Meeting, and 50th Annual SBBq Meeting – Virtual Meeting, October 4-8, 2021, São Paulo, Brasil. **IUPAB fellowships (20th IUPAB Meeting Award)**
6. **T. Pajić**, N. Todorović, M. Zivić, M. D. Rabasović, A.H.A. Clayton, and A. Krmpot. Label-free Third Harmonic Generation Imaging of Lipid Droplets in Live Filamentous Fungi. VIII

International School and Conference on Photonics PHOTONICA 2021 & HEMMAGINERO workshop, 23 August – 27 August 2021, Belgrade, Serbia. **3rd Best Poster Award**

7. **Tanja Pajić**, Nataša Todorović, Aleksandar Krmpot, Mihailo Rabasović, Branislav Jelenković, Miroslav Živić. *In Vivo* Metabolic Imaging of Fungus *Phycomyces blakesleeanus* Using Label-Free Nonlinear Laser Scanning Microscopy. 13th Photonics Workshop, March 8-12, 2020, Kopaonik, Serbia.
8. **T. Pajic**, K. Stevanovic, N. Todorovic, A. Krmpot, M. Rabasovic, B. Jelenkovic and M. Zivic. Combined two photon excitation fluorescence and third harmonic generation imaging of redox ratio for monitoring metabolic state of live cells of fungus *Phycomyces blakesleeanus*. 14th MULTINATIONAL CONGRESS ON MICROSCOPY, ‘‘MCM2019’’, September 15–20, 2019, Belgrade, Serbia.
9. **T. Pajic**, K. Stevanovic, N. Todorovic, A. Krmpot, M. Rabasovic, B. Jelenkovic and M. Zivic. *In vivo* Third Harmonic Generation Imaging of *Phycomyces blakesleeanus*. The Seventh International School and Conference on Photonics, ‘‘PHOTONICA 2019’’, 26 August – 30 August 2019, Belgrade, Serbia.
10. **Tanja Pajić**, Katarina Stevanović, Nataša Todorović, Aleksandar Krmpot, Mihailo Rabasović, Vladimir Lazović, Dejan Pantelić, Brana Jelenković, Miroslav Živić. Successful Ti: Sapphire laser cell surgery of *Phycomyces blakesleeanus* cell wall. 8th Regional Biophysics Conference (RBC2018), May 16 – 20. 2018, Zreče, Slovenia.
11. **T. Pajic**, K. Stevanovic, N. Todorovic, A. Krmpot, M. Rabasovic, V. Lazovic, D. Pantelic, B. Jelenkovic, and M. Zivic. *Phycomyces blakesleeanus* hypha cell wall surgery by Ti:Sapphire laser. The Sixth International School and Conference on Photonics PHOTONICA 2017, August 28 – September 1. 2017., Belgrade, Serbia

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу из дисертације (M64)

1. **Тања Пајић**, Сузана Козакијевић, Јована Лукичић, Мирослав Живић, Александар Крмпот, Михаило Рабасовић, Наташа Тодоровић. *In vivo* осликовање појединачних хифа *Phycomyces blakesleeanus* методом мултифотонске микроскопије: утицај селенита на морфологију и функцију митохондрија. Трећи конгрес биолога Србије, 21 - 25. септембар 2022., Златибор, Србија.
2. **T. Pajić**, K. Stevanović, N. Todorović, A. Krmpot, M. Rabasović, V. Lazović, D. Pantelić, B. Jelenković and M. Zivić. Uklanjanje ćelijskog zida sa hifa gljive *Phycomyces blakesleeanus* korišćenjem femtosekundnih laserskih impulsa. Second Congress of Biologists of Serbia 2018, 25-30. September 2018, Kladovo, Serbia.

Предмет и циљеви докторске дисертације

Предмет ове докторске дисертације је примена различитих модалитета нелинеарне ласерске скенирајуће микроскопије (НЛСМ) за проучавање физиологије и енергетског метаболизма живих ћелија кончастих гљива. Поменуте технике треба да омогуће да се у живом организму, у интактном стању, врше посматрања и мерења од значаја за разумевање низа физиолошких процеса. Предмет рада ове дисертације је подељен на два основна циља. Први циљ је да се фемтосекундни ласер искористи за манипулацију на ћелијама у сврху развијања ласерске нанохирургије ћелијског зида кончастих гљива којим би се омогућила регистрација струја кроз појединачне јонске канале на ћелијској мембрани, које су готово у потпуности непознате код кончастих гљива. Други циљ је развијање и оптимизовање методе нелинеарне микроскопије за структурно и функционално осликавање ћелијског метаболизма кончасте гљиве *Phycomyces blakesleeanus*, коришћењем два модалитета нелинеарне оптичке микроскопије *THG* (енг. Third Harmonic Generation) и *TPEF* (енг. Two Photon Excitation Fluorescence). Ова два главна циља су подељена на додатне потциљеве и задатке.

Први циљ: Развијање и оптимизовање методе ласерске нанохирургије ћелијског зида на моделу живе гљиве *P. blakesleeanus* ради добијања прецизног реза како би се обезбедило добијање интактне ћелијске мембране и омогућило добијање гигаомског контакта који је неопходан услов за регистровање струја кроз појединачне јонске канале. Овај циљ је разрађен кроз **седам потциљева** који обухватају осмишљавање протокола гајења који ће дати хифе гљива погодне за нанохирургију, тестирање низа услова за хипер- и хипоосмотски третман за плазмолизу и деплазмолизу хифа са циљем да се ћелијска мембрана максимално брзо одвоји и довољно ефикасно, поновљиво и реверзибилно повуче од ћелијског зида, а протопласт успешно ослободи кроз хируршки направљен рез, затим наћи услове за успешно уклањање ћелијског зида са хифа кроз утврђивање локације сечења дуж хифа и избором одговарајућих параметара хирургије (избор таласне дужине, објектива, снаге односно енергије импулса, време задржавања ласерског снопа у тачки, као и избор образаца сечења). Четврти и пети потциљ су анализирање утицаја различитих параметара (ширина хифа, дужина реза, удаљеност реза од протопласта, концентрација калцијума) на вероватноћу ослобађања протопласта и испитивање утицаја различитих локација хирургије дуж хифе на вероватноћу ослобађања и број изашлих протопласта. Шести потциљ је карактеризација хируршког реза и протопласта помоћу скенирајуће електронске микроскопије. Последњи потциљ је регистровати струје појединачних јонских канала на мембрани протопласта коришћењем методе наметнуте волтаже на делићу мембране као тест успешности извршене ласерске нанохирургије.

Други циљ: Развијање и оптимизовање методе нелинеарне микроскопије за структурно и функционално осликавање ћелијског метаболизма кончасте гљиве *P. blakesleeanus*. Овај циљ је разрађен кроз **шест потциљева**. Прва два потциља подразумевају испитивање могућности за осликавање липидних капи (ЛК) код живих и необојених појединачних хифа користећи *THG* модалитет НЛСМ и развој методе *Image Correlation Spectroscopy* за квантификацију ЛК која досад није коришћена за анализу *THG* слика и поређење резултата са уобичајеним софтверским пребројавањем честица доступним у слободним пакетима као што је *ImageJ*. Следећи циљ је примена *THG* модалитета на осликавање ЛК у хифама подвргнутим различитим експерименталним третманима, као што су они за које је позната врста и смер очекиваног ефекта на ЛК (изгладњивање ускраћивањем азота) и они за који није познато какве ефекте има на ЛК (третман натријум селенитом). У оквиру овог циља је потребно утврдити да ли се *THG* осликавањем може измерити физиолошка промена броја, величине и дистрибуције ЛК и испитати утицај различитих концентрација селенита на метаболизма хифа. Четврти потциљ се односи на примену *TPEF* модалитета на осликавање митохондрија у хифама подвргнутим истим третманима као и приликом *THG* осликавања. Пети потциљ је испитати утицај повишене температуре гајења на промене енергетског метаболизма, динамику ЛК и митохондрије. Последњи потциљ је тестирати могућност

добијања информације о редокс стању ћелија (промени метаболичког стања) помоћу двофотонске микроскопије коришћењем аутофлуоресценције ендогених флуорофора NAD(P)H и FAD.

Кратак опис садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација под насловом „Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива“ написана је на српском језику на **119 страна** рачунајући текст дисертације. Дисертација је структурирана кроз следећа поглавља: **Увод** (стр. 1-25), **Циљеви истраживања** (26-27), **Материјал и методе** (28-46), **Резултати** (47-84), **Дискусија** (85-93), **Закључци** (94-95) и **Литература** (96-119, укупно 350 библиографских јединица наведених по абecedном реду). Дисертација садржи **37 слика** (5 слика у поглављу Увод, 5 слика у поглављу Материјал и методе и 27 слика у поглављу Резултати) и **4 табеле** (3 табеле у поглављу Материјал и методе и 1 табела у поглављу Резултати). Дисертација има укупно **134 стране** рачунајући уобичајене уводне и завршне елементе са неопходним информацијама о докторској дисертацији: Насловну страницу на српском језику, Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Страну са изјавама захвалности, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику, Листу скраћеница и Садржај. На крају докторске дисертације се налазе Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Увод се састоји се из три главна поглавља и седам потпоглавља у којима је дат преглед досадашњих сазнања из литературе која се тичу проблематике докторске дисертације. На почетку уводног поглавља је дат опис екологије и значаја кончастих гљива, опис њихове физиологије и метаболизма са посебним освртом на кључне органеле липидног и енергетског метаболизма, затим одговор кончастих гљива на недостатак азота и промену околне температуре, као и ефекат који изазива селенит код гљива. Даље је дат општи преглед нелинеарне оптичке микроскопије и посебно истакнуте њене јединствене предности у односу на линеарну оптичку микроскопију. У последњем делу Увода је дат преглед литературе о фемтосекундној ласерској нанохирургији, физиологији јонских канала код кончастих гљива и могућности примене ове методе за истраживање јонских струја код кончастих гљива, као и детаљан опис микроскопије детектовања сигнала трећег хармоника, осликавање липидних капи без обележавања узорка и примене различитих метода за анализу слика.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања**, јасно су дефинисана два основна циља и више подциљева.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња детаљно описује све протоколе и истраживачке методе коришћене у изради експеримената у оквиру ове докторске дисертације. У почетном делу су наведени медијуми и раствори коришћени током израде експеримената и описан протокол гајења модел система за различите третмане. Затим су описани различити експериментални протоколи, инструменталне поставке и припреме узорака за осликавање и ћелијску хирургију. Кандидаткиња је детаљно описала инструменталну поставку за нелинеарну ласерску скенирајућу микроскопију и параметре снимања. На крају овог поглавља је описана квантитативна анализа слика добијених различитим микроскопијама и статистичка обрада резултата.

У делу **Резултати**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате својих истраживања у оквиру 16 подпоглавља (4 поглавља) груписаних у оквиру две основне тематске целине, и која су адекватно илустрована кроз одговарајуће микрографије, графичке и табеларне приказе (27 панелних слика). Поголавља у потпуности одговарају постављеним циљевима, и из њих се изводе закључци дисертације.

У поглављу **Дискусија** је на почетку дат сиже остварених резултата, а затим је систематично подељена на четири целине у којима је изнет критички осврт на добијене резултате.

Закључци су изведени према претходно наведеним конкретним циљевима а формиран на основу добијених резултата.

У поглављу **Литература** наведено је 350 библиографских јединица, што указује да је кандидат темељно и студиозно приступио изучавању проблематике докторске дисертације.

Остварени резултати, оцена докторске дисертације и научни допринос

Научни допринос ове докторске дисертације се огледа кроз више аспеката примене напредних техника нелинеарне ласерске микроскопије у разумевању физиологије кончастих гљива. У оквиру ове дисертације је развијена метода мултифотонског осликавања и фемтосекундне (фс) ласерске нанохирургије ћелијског зида кончасте гљиве *P. blakesleeanus*, чиме се ова техника први пут уводи у научна истраживања у Србији. Увођење ове методе отвара пут за истраживање физиологије јонских канала директно на ћелијској мембрани кончастих гљива која је иначе недоступна због присуства чврстог ћелијског зида. У овој дисертацији је упоредо развијен протокол за *in vivo* осликавање липидних капи без обележавања за истраживање липидног метаболизма помоћу модалитета THG нелинеарне ласерске микроскопије, који досад није примењен на кончастим гљивама. Примена ове методе је пружила прва сазнања о динамици и расподели липидних капи у мицелијуму живе гљиве *P. blakesleeanus*, под дејством азотног гладовања, натријум селенита и повишене температуре. Такође, ICS метод квантификације који досад није примењен на THG сликама је омогућио ефикасну и прецизну екстракцију података са слика. Додатно, продужено *in vivo* осликавање динамике митохондрија у различитим третманима помоћу модалитета TPEF нелинеарне микроскопије је дало нове увиде у структурне и функционалне промене ћелијског метаболизма кончасте гљиве *P. blakesleeanus*. У прилог савремености и оригиналности резултата истраживања говори то да су они објављени у врхунским међународним научним часописима највиших категорија, M21a и M21.

Закључак и предлог

Анализа докторске дисертације кандидаткиње Тање Пајић под насловом „Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива“ показује да је кандидаткиња у својој докторској дисертацији успешно реализовала постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан и адекватно конципиран експериментални рад. Ова докторска дисертација представља оригиналан научно-истраживачки рад у области биофотонике који истражује физиологију кончастих гљива применом напредних метода нелинеарне ласерске скенирајуће микроскопије, у коњујкцији са низом других биофизичких метода. Кандидаткиња је овим истраживањем показала самосталност у раду, научну зрелост и креативност који потврђују спремност за даљи самостални научно-истраживачки рад и сарадњу са мултидисциплинарним научним тимовима. У спроведеном истраживању је коришћен савремен и мултидисциплинаран приступ, доследно су примењене научне методе, а произведени резултати имају висок научни значај и јасну примењивост.

Резултати добијени експерименталним радом који су представљени у овој докторској дисертацији су оригинални и значајни, као и адекватно представљени, анализирани и протумачени. На основу свега наведеног, Комисија за оцену докторске дисертације предлаже Већу за студије при Универзитету да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње Тање М.Д. Пајић под насловом „Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива“ и одобри јавну одбрану.

У Београду, 07.05.2024.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др Александар Крмпот, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за физику
Београд, Институт од националног значаја за
Републику Србију

Др Наташа Тодоровић, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“, Институт од
националног значаја за Републику Србију

Др Марина Станић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за
мултидисциплинарна истраживања

Др Наташа Несторовић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за биолошка
истраживања „Синиша Станковић“, Институт од
националног значаја за Републику Србију

Већу за студије при Универзитету у Београду

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду извршена је софтверска провера оригиналности докторске дисертације „Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива“ кандидаткиње Тање Пајић коришћењем програма iThenticate. Увидом у извештај утврђена је подударност од 5%. Подударност са једним извором износи 1%. Извор са којим је нађена ова подударност је рад у међународном часопису који је објавила кандидаткиња и из кога је проистекла сама теза. Ово је случај и са другим извором на листи који већ има подударање мање од 1%. И трећи извор на листи је рад у часопису чији је кандидаткиња аутор. Подударност са осталим изворима износи мање од 1% и односи се на генералне фразе и навођење литературе. Када се изнето узме у обзир, извештај потврђује оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Тање Пајић, под насловом „Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 25.04.2024.

Ментори:

Др Михаило Рабасовић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за физику у
Београду

Проф. др Мирослав Живић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Биолошки факултет