

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

PREDMET: Izveštaj stručne komisije i ocena završene doktorske disertacije dr Jelene Radovanović Dimitrijević pod nazivom „Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela“.

Na osnovu člana 50. Statuta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na redovnoj sednici Naučno-nastavnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 10.5.2022. godine, doneta je odluka o imenovanju stručne komisije za ocenu završene doktorske disertacije kandidatkinje dr Jelene Radovanović Dimitrijević, pod nazivom: „Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela“ u sastavu:

1. dr sc. Jelena Mandić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

2. dr sc. Sanja Milutinovic-Smiljanić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

3. dr sc. Zorica Bulat, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

4. dr sc. Marijana Ćurčić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

5. dr sc. Emina Sudar Milovanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

6. dr sc. Stoimir Kolarević, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Nakon analize dostavljenog teksta doktorske disertacije i priložene dokumentacije, komisija podnosi Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

IZVEŠTAJ

1. BIOGRAFSKI PODACI O KANDIDATKINJI

Jelena Radovanović Dimitrijević rođena je 29.11.1989. godine u Beogradu. Završila je Petu gimnaziju u Beogradu i dobitnik je Vukove diplome. Školske 2008/2009. godine upisala je osnovne integrisane studije na Stomatološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu. Diplomirala je

septembra 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,16 i stekla zvanje doktor stomatologije. U toku studija na Stomatološkom fakultetu bila je autor studentskog rada pod nazivom „Profilaktička primena nimesulida za kontrolu postoperativnog bola nakon hirurškog vađenja umnjaka“, koji je prezentovan na Kongresu studenata biomedicinskih nauka 2012. godine. Pripravnički staž je završila tokom 2014/2015. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Po obavljenom pripravničkom stažu, položila je državni ispit decembra 2015. godine pri Ministarstvu zdravlja Republike Srbije.

Doktorske akademske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2015/2016. godine. U okviru doktorske disertacije proučavala je mehanizme subakutne toksičnosti fluorida i protektivno dejstvo selena, kod eksperimentalnih pacova. Pohađala je više kurseva i edukacija iz oblasti stomatologije i molekularne genetike.

Od 2019. godine zaposlena je u laboratoriji za Radiobiologiju i Molekularnu genetiku na Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. U septembru 2020. godine izabrana je u istraživačko zvanje – istraživač-saradnik. Trenutno je angažovana na istraživačkoj temi „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum-kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja“, br. 0802201 čiji je rukovodilac prof. dr Esmā Isenović naučni savetnik, u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku. Jelena Radovanović Dimitrijević je član Srpskog lekarskog društva i Stomatološke komore.

U svom dosadašnjem radu bila je koautor na šest publikacija u časopisima međunarodnog značaja i na jednom poglavlju u knjizi. Deo rezultata dobijenih u istraživanjima sprovedenim u okviru doktorske disertacije objavila je u međunarodnom časopisu *Chemosphere* (IF=7,086, M21), DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128978.

2. OSNOVNI PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 10.10.2019. godine, dalo je saglasnost zavedenu pod brojem 61206-1781/4-19, na predlog teme doktorske disertacije kandidatkinje dr Jelene Radovanović Dimitrijević pod nazivom: „Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela“. Za mentore disertacije imenovani su dr sc. Zoran Mandinić, vanredni profesor, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i izveštaja iz programa **iThenticate** kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela“, utvrđeno je da podudaranje sa drugim izvorima iznosi 13%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je manjih podudarnosti u delovima rečenica koje su delovi ranije objavljenih radova, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz disertacije, objašnjenja načina sprovođenja eksperimenta, naziva organizacija, korišćenja sličnih izraza kod materijala i metoda što je dozvoljeno u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i ukazuje na originalnost ove doktorske disertacije.

3. PREDMET I SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr Jelene Radovanović Dimitrijević je napisana na 136 strana i ilustrovana sa 114 slika i 28 tabela. Doktorska disertacija sadrži zahvalnicu, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica i poglavlja: uvod, hipotezu i ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate istraživanja, diskusiju, zaključke, biografiju i pregled literature.

U **uvodu** ove disertacije je ukazano na značaj adekvatne profilaktičke upotrebe fluorida. Detaljno su opisana fizičko-hemijska svojstva fluorida, kao i njihova zastupljenost u hrani i vodi. Zatim, opisani su putevi unošenja fluorida u organizam, kao i apsorpcija, distribucija i eliminacija. U nastavku su opisani mehanizmi delovanja fluorida na zubna tkiva i preporuke za upotrebu suplemenata sa fluoridima kod dece. Osim toga, ukazano je da s druge strane prekomeran unos fluorida može doprineti razvoju lokalne i/ili sistemske toksičnosti i opisani su mehanizmi toksičnosti fluorida. U okviru lokalne toksičnosti, detaljno su opisani indeksi fluoroze zuba. Zatim, razmotreni su mehanizmi sistemske toksičnosti fluorida na kalcifikovana, ali i na meka tkiva ljudi i životinja. Kao ključni mehanizmi toksičnosti povišenih koncentracija fluorida navode se nastanak oksidativnog stresa i DNK oštećenje, ali i njihova potencijalna interakcija sa bioelementima. U nastavku, opisana su fizičko-hemijska svojstva selena, bioelementa koji pozitivno utiče na antioksidativni sistem, reparaciju DNK oštećenja i neutrališe slobodne radikale. Pregledom literature opisana su protektivna svojstva suplementacije selenom na oksidativni stres izazvan povišenim koncentracijama fluorida.

U **hipotezi** istraživanja pretpostavljeno je da će primena rastućih koncentracija fluorida (10, 25, 50, 100 i 150 mg/l) putem vode za piće nakon 28 dana izazvati oštećenja različitih organa kod mužjaka *Wistar* pacova, kao i da će antioksidans selen u koncentraciji od 1,5 mg/l protektivno uticati na oštećenja izazvana fluoridima. Na osnovu hipoteze, postavljeni su sledeći **ciljevi**:

- Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na telesnu masu *Wistar* pacova i zapreminu konzumirane vode;
- Ispitivanje koncentracija fluorida u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova;
- Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na histološku strukturu mekih i kalcifikovanih tkiva *Wistar* pacova;
- Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na parametre redoks statusa u krvi i mekim tkivima kod *Wistar* pacova;
- Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na distribuciju bioelemenata-cinka, bakra, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova;
- Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na stepen oštećenja DNK molekula u krvi i mekim tkivima *Wistar* pacova;
- Ispitivanje dozne zavisnosti efekata fluorida;
- Ispitivanje uticaja selena na krv, meka i kalcifikovana tkiva *Wistar* pacova;
- Ispitivanje uticaja selena na oštećenja izazvana fluoridima-morfološke promene, oksidativni stres, oštećenje DNK i nivoje bioelemenata u ispitivanim tkivima.

U poglavlju **materijal i metode**, detaljno su opisane hemikalije i reagensi, kao i eksperimentalni postupak. Za potrebe istraživanja korišćeno je 40 laboratorijskih pacova (*Rattus norvegicus*) *Wistar* soja muškog pola, starosti osam nedelja. Tokom trajanja eksperimenta, pacovi su nasumično podeljeni u osam grupa (po pet u grupi) i bili smešteni u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Pacovima su rastvori sa fluoridima i/ili selenom davani u vodi za piće tokom 28 dana, dok je kontrolna grupa pila vodu sa česme. Tokom trajanja eksperimenta, merena je telesna masa životinja kao i unos vode i hrane po grupi. Nakon 28 dana, eksperimentalne životinje su eutanazirane u skladu sa etičkim načelima, a zatim su sakupljeni krvi i izolovani sledeći organi: jetra, slezina, bubrezi, mozak, testisi, zubi i femur. U nastavku ovog poglavlja, opisani su postupci određivanja koncentracija fluorida, histološke i histomorfometrijske analize, određivanja parametara redoks statusa, određivanja koncentracija bioelemenata, eksperimentalni postupak izvođenja komet testa u krvi i tkivima, kao i statističke analize.

Rezultati istraživanja su pokazali da subakutna ekspozicija povišenim koncentracijama fluorida dovodi do morfoloških oštećenja tkiva jetre i bubrega. Zatim, fluoridi su uticali na parametre redoks statusa, u najvećoj meri aktivnost superoksid anjona i nivoje sulfhidrilnih grupa i malondialdehida, kao i aktivnost superoksid dismutaze u plazmi, jetri, bubrezima, slezini, mozgu i testisima pacova. Fluoridi su uticali

na disbalans koncentracija bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima. Genotoksični potencijal fluorida je potvrđen u jetri, slezini, mozgu i testisima. Najviše koncentracije fluorida uočene su u zubima i femuru, dok fluoroza zubnih tkiva nije zabeležena. Nadalje, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da selen nije uticao na smanjenje morfoloških oštećenja jetre i bubrega, ali je značajno smanjio oštećenja DNK u jetri i slezini. Antioksidativni efekat selena potvrđen je pozitivnim uticajem na pojedine parametre redoks statusa, ali selen je ispoljio i oksidativni efekat u pojedinim tkivima. Analizom koncentracija bioelemenata, pokazano je da je selen sa fluoridima delovao antagonistički i sinergistički. *Benchmark* metodologijom potvrđeno je da su efekti fluorida na pojedine parametre redoks statusa, bioelemente i DNK oštećenje dozna zavisni.

U **diskusiji**, dr Radovanović Dimitrijević dobijene rezultate analizira u sklopu postojećih saznanja koja se tiču mehanizama toksičnosti fluorida, kao i potencijalnih protektivnih svojstva selena. Istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije su pokazala da su najviše koncentracije fluorida zabeležene u zubima i femuru, što potvrđuje hipotezu da se fluoridi najviše deponuju u koštanim tkivima. Zatim, povišene koncentracije fluorida dovele su do morfoloških oštećenja jetre i bubrega pacova, čime je potvrđena hipoteza da ovi organi imaju primarnu ulogu u metabolizmu i eliminaciji fluorida. U nastavku ovog poglavlja potvrđena je hipoteza da povišene doze fluorida dovode do oksidacije lipida i proteina, i do poremećaja aktivnosti parametara antioksidativne zaštite, čime je potvrđena hipoteza da je jedan od mehanizama toksičnosti fluorida nastanak oksidativnog stresa. Dalje, detaljno je opisan uticaj fluorida na koncentracije bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima pacova, i pokazano je da fluoridi utiču na disbalans ovih bioelemenata. Takođe, potvrđeno je da DNK oštećenje čini jedan od mehanizama toksičnosti fluorida, s obzirom da su rastuće koncentracije fluorida dovele do oštećenja DNK ćelija jetre, slezine, mozga i testisa. U ovoj studiji su potvrđeni i dozna zavisni efekti fluorida na promene pojedinih parametara, odnosno pokazano je da fluoridi i pri izuzetno niskim koncentracijama utiču na promene parametara redoks statusa, nastanak genotoksičnosti i na koncentracije bioelemenata kod eksperimentalnih pacova. U okviru diskusije takođe je detaljno objašnjen i uticaj selena na oštećenja izazvana fluoridima. U ovom *in vivo* eksperimentu, selen je u najvećoj meri protektivno delovao na parametre redoks statusa i DNK oštećenje u pojedinim tkivima, čime je potvrđena hipoteza da selen ispoljava protektivno dejstvo na oštećenja izazvana fluoridima. S obzirom da je ovo prva studija koja je prikazala i zajednički uticaj fluorida i selena na koncentraciju bioelemenata kod pacova, treba istaći da je pokazano da su ova dva elementa primenjena istovremeno imala i antagonistički, ali i sinergistički odnos.

U **zaključcima** doktorske disertacije odgovori su jasno formulisani. Kandidatkinja navodi da subakutna ekspozicija povišenim koncentracijama fluorida, selenu i kombinaciji fluorida i selena utiče na smanjenje unosa vode kod pacova, ali ne i na prinos mase. Zatim, uočeno je da su najviše koncentracije fluorida u mekim tkivima zabeležene u grupama sa srednjim dozama fluorida, dok su najviše koncentracije fluorida zabeležene u kalcifikovanim tkivima grupe pacova koji su pili vodu sa najvišom dozom fluorida. Sistemska ekspozicija povišenim koncentracijama fluorida dovela je do patohistoloških promena jetre i bubrega, dok suplementacija selenom nije smanjila nastala oštećenja. Nadalje, fluoridi su uticali na nastanak oksidativnog stresa, oksidaciju lipida i proteina i poremećaj antioksidativne zaštite u plazmi, jetri, bubrezima, mozgu i testisima pacova, a potvrđeni su dozno zavisni efekti fluorida na pojedine parametre redoks statusa. Suplementacija selenom zajedno sa fluoridima uticala je na pojedine poremećene nivoe parametara redoks statusa u plazmi, bubrezima, mozgu i testisima, ali je selen ispoljio i oksidativna svojstva, s obzirom da je samostalno primenjen uticao na disbalans pojedinih parametara u jetri i bubrezima pacova. Sistemska ekspozicija fluoridima putem vode uticala je na disbalans koncentracija bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima, i potvrđeni su dozno zavisni efekti fluorida na promene koncentracija pojedinih bioelemenata u krvi, jetri, bubrezima, mozgu, zubima i femuru. Suplementacija selenom samostalno, ali i u kombinaciji sa fluoridima takođe je uticala na disbalans koncentracija bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvim, mekim i kalcifikovanim tkivima. U okviru zaključaka istaknuto je da je sistemska ekspozicija fluoridima nakon 28 dana dovela do oštećenja DNK ćelija jetre, slezine mozga i testisa, kao i da su potvrđeni dozno zavisni efekti fluorida na oštećenja DNK u slezini i testisima. Primena selena uticala je na smanjenje oštećenja DNK u jetri i slezini. Primenom *Benchmark* metodologije, utvrđen je kritičan dozno zavisni štetni efekat fluorida u bubrezima i testisima za smanjenje aktivnosti antioksidativnog parametra superoksid dismutaze 1 kao i za povećanje oštećenja DNK u testisima, pri čemu su najniže koncentracije fluorida iznosile 1e-04 mg/kg.

Poglavlje **literatura** sadrži 377 bibliografskih jedinica iz relevantne literature. Kandidatkinja je navela veliki broj literature novijeg datuma publikovanja, čime je doprinela savremenom sagledavanju tematike.

ZAKLJUČNO MIŠLJENJE

Dr Jelena Radovanović Dimitrijević se u okviru svoje doktorske disertacije bavi aktuelnim pitanjima vezanim za potencijalni štetni efekat fluorida usled izloženosti povišenim koncentracijama i potencijalnog kumulativnog efekta. U okviru ove studije detaljno su opisani mehanizmi subakutne toksičnosti fluorida na krv, meka i kalcifikovana tkiva eksperimentalnih pacova. Kandidatinja je takođe ukazala i na protektivno dejstvo selena na oštećenja izazvana fluoridima.

Na osnovu značaja dobijenih rezultata, članovi komisije predlažu Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati Izveštaj komisije o pozitivnoj oceni doktorske disertacije dr Jelena Radovanović Dimitrijević pod nazivom: „Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela“ i da odobri javnu odbranu doktorske disertacije.

U Beogradu _____ godine.

Članovi komisije:

Jelena Mandić

dr sc. Jelena Mandić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Sanja Milutinović-Smiljanić

dr sc. Sanja Milutinović-Smiljanić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Zorica Bulat

dr sc. Zorica Bulat, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Marijana Čurčić

dr sc. Marijana Čurčić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Emina Sudar Milovanović

dr sc. Emina Sudar Milovanović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Stoimir Kolarević

dr sc. Stoimir Kolarević, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju