

РЕПУБЛИКА СРПСКА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊА ЛУЦИ Образак -3
Природно-математички факултет
Број: 19-2778/13
Датум: 21. 10. 2013. год
БАЊА ЛУКА

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊА ЛУЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



ИЗВЈЕШТАЈ
о оцјени урађене докторске тезе

ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

др Живојин Ерић, редовни професор (ужа научна област: Микробиологија, биологија ћелије), Природно-математички факултет Универзитета у Бања Луци, предсједник

др Милица Матавуљ, редовни професор (ужа научна област: Цитологија и хистологија) Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, ментор, члан

др Радослав Гајанин, редовни професор (ужа научна област: Патологија) Медицински факултет Универзитета у Бања Луци, члан.

Одлуком Наставно-научног вијећа Природно-математичког факултета Универзитета у Бања Луци број 19/3.626/2013 од 18. 9.2013. године именовани смо у Комисију за преглед, оцјену и одбрану завршене докторске дисертације **мр Смиљане Параш** под називом **Морфолошке и ултраструктурне промене ендокриног панкреаса пацова Wistar која под утицајем високофреквентних електромагнетних поља**. На основу прегледа ове докторске дисертације Наставно-научном вијећу Природно-математичког факултета подносимо сљедећи извјештај:

Датум и орган који је именовao комисију. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звање, назив уже научне области за коју је изабран у звање и назив универзитета и факултета у којој је члан комисије запослен.

1. УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСKE ТЕЗЕ

Докторска дисертација мр Смиљане Параш написана је на 153 странице и садржи 17 графикана, 52 слике, 14 табела у склопу текста и 33 табеле у прилогу и 143 литературна навода. Подијељена је у осам поглавља: Увод (38 страна), Циљ (1 страна), Материјал и методе рада (11 страна), Резултати (47 страна), Дискусија (11 страна), Закључак (4 стране), Литература (8 страна) и Прилог (33 стране), те садржи Сажетак на српском и енглеском језику (4 стране).

а) Истаћи основне податке о докторској тези: обим, број табела, слике, број цитиране литературе и навести поглавља.

2. УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У уводном поглављу је изложена основна проблематика везана за утицај високофреквентних електромагнетних поља (ВФ ЕМП) на биолошке системе. Указује се да посљедњих година драматично расте забринутост јавности у вези са здравственим посљедицама које могу настати услјед повећане изложености људи ВФ ЕМП која емитују мобилни телефони, њихове базне станице и антене. Из ових разлога проводе се бројна експериментална и епидемиолошка истраживања која се баве питањем везаним за ову проблематику. Поред показаног канцерогеног дјеловања ВФ ЕМП досадашња испитивања су показала и бројне друге штетне здравствене ефекте које ова поља имају. Од посебног су интереса резултати досадашњих испитивања дејства ВФ ЕМП на ендокрини панкреас која указују на њихово могуће дијабетогено дјеловање, што многи истраживачи доводе у везу са драстичним повећањем инциденце дијабетеса у високо урбаним срединама и у вези са тим наводе се бројни литературни подаци који представљају сазнања из посљедњих десет година везани за ову проблематику. На јасан и прегледан начин су представљена досадашња сазнања везана за утицај високофреквентних електромагнетних поља на морфологију алфа, бета, Д и ПП ћелија Лангерхансових острва из којих се још увијек не може извући недвосмислен закључак о ефектима ВФ ЕМП на ткиво ендокриног панкреаса, будћи да су у експериментима кориштени различити експериментални модели са различитом фреквенциом и интензитетом примјењених ВФ ЕМП. Посебан акценат је стављен на податке који се односе на структурне и ултраструктурне промјене бета ћелија Лангерхансових острва под утицајем ВФ ЕМП и детаљно су обрађени литературни подаци који се односе на могуће дијабетогено дјеловања ових поља. Исто тако, детаљно су описани цитолошки, морфометријски и стереолошки параметри које је, према литератури, неопходно анализирати да би се поуздано установиле структурне промјене Лангерхансових острва, као и свих типова његових ћелија под утицајем ВФ ЕМП.

Сумарно се може рећи да су у уводном поглављу детаљно и јасно презентовани подаци неопходни за разумијевање комплексности проблематике везане за дјеловања ВФ ЕМП на ендокрини панкреас при чему је консултована обимна литература и приказана су најновија сазнања везана за истраживању проблематику. Неконзистентност резултата досадашњих истраживања је разлог тренутног интензивног истраживања ове проблематике у многим свјетским лабораторијама, што је и за мр Смиљану Параш било опредјељујуће за избор ове теме за израду докторске дисертације.

- а) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и циљ истраживања;
- б) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан;
- в) Навести допринос тезе у рјешавању изучаване проблематике;
- г) У прегледу литературе треба водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Испитивање утицаја високофреквентних електромагнетних поља на ендокрини панкреас извршено је на мужјацима бијелих лабораторијских пацова соја Wistar узгајаних у

виваријуму на Природно-математичком факултету у Бања Луци. У моменту почетка студије, два мјесеца старе животиње подијељене су у двије експерименталне групе: прву групу су чиниле 21 животиња које су биле одређене за излагање високофреквентним електромагнетним пољима и другу, контролну групу, са 20 животиња које нису биле у контакту са било каквим електромагнетним пољима високе или ниске фреквенције.

Животиње намијењене за третман високофреквентним електромагнетним пољима излагане су дјеловању ових поља од њиховог 60-ог до 90-ог постнаталног дана, 2 сата дневно, 5 радних дана у недјељи. Истраживање је изведено уз одобрење Етичког комитета за експерименталне животиње Природно-математичког факултета у Бања Луци.

Извор електромагнетног поља високе фреквенције била је базна станица мобилне телефоније Републике Српске која је монтирана на зграду Телекома у Бања Луци. Ова базна станица емитује електромагнетна поља фреквенције 1,9 GHz, а мјерењем (мјерење је извршила фирма „ЗАШТИТА“ д. о. о. Бања Лука) је утврђена тачка гдје та поља имају највећи интензитет (јачина 4,79 V/m, снага 0,24 A/m и SAR вриједност: 2,0 W/m²). Ова тачка се налазила у парку Младен Стојановић у Бања Луци и на ту површину су изношени кавези са експерименталним животињама и спуштани директно на травнату површину парка.

Након истека тридесетодневног излагања животиње су тридесет и првог дана жртвоване декапитацијом у диетил етар наркози. Узорци панкреаса узети су одмах након жртвовања животиња обје групе и прослијеђени даље у процедуру припреме за свјетлосно-микроскопска и електроно-микроскопска испитивања која су омогућила адекватну квалитативну и квантитативну анализу промјена на ендокрином панкреасу контролних животиња и животиња излаганих ВФ ЕМП.

За свјетлосно микроскопска испитивања узети узорци панкреаса су фиксирани 48 сати у пуферованом Bouin-овом раствору, послје чега су испирани у 70% етанолу са додатком јода, а затим су прослијеђени кроз стандардну процедуру дехидратације, просвјетљавања и калупљења у парафину. Добијени парафински калупи су сјечени у серијске пресјеке дебљине 4 μ m. Резови су даље бојени хистохемијским методама: хематоксилином и еозином, методом Викторија плаво 8GX- флоксин свјетло зелено и методама Mallory-Azan и Masson методом које су омогућиле диференцирање ендокрине компоненте панкреаса, као и везивног ткива и крвних судова каји им припадају.

За имунохистохемијска испитивања на парафинским резovima панкреаса, односно за приказивање и локализацију појединих ендокриних ћелија Лангерхансових остраваца коришћена је DAKO LSAB⁺/HRP техника. У процесу имунохистохемијског бојења коришћена су примарна антитјела за глукагон, инсулин, панкреасни полипептид и соматостатин.

Резултати свјетлосно-микроскопске анализе парфинских резова панкреаса бојених хистохемијским и имунохистохемијским методама су документовани фотографијама направљеним на свјетлосном микроскопу марке Philips.

Електронско-микроскопска испитивања бета ћелија Лангерхансових острва извршена су на узорцима панкреаса од 5 контролних и 5 зрачених животиња, који су спроведени кроз процедуру припреме узорка за електронску микроскопију, а њихови ултратнки пресједи су

анализирани на електронском микроскопу OPTON 9S-2, уз употребу система за анализу слике са MEGA VIEW камером којом су направљене микрографије најрепрезентативнијих бета ћелија.

Квантитативна анализа Лангерхансових острва и његових ендокриних ћелија контролних и зрачених животиња је извршена линеарним мјерењем и стереолошком анализом. Линеарним мјерењем је одређен дијаметар Лангерхансових острва, а стереолошка анализа Лангерхансових острва, као и његових ћелија вршена је «point-counting» техником употребом Weibel-овог многонамјенског тестног система (M42). Овом методом одређена је волуменска, нумеричка и површинска густина и Лангерхансових острва и свих типова њихових ћелија (А, Б, Д и ПП ћелије), као и волуменска густина везива и крвних судова Лангерхансових острва, а за све типове ендокриних ћелија Лангерхансових острва додатно је још одређен и нуклеоцитоплзматски однос.

Исто тако извршена је стереолошка анализа ултраструктурних параметара бета ћелија панкреаса контролних и зрачених животиња са електронмикрографија познатог увећања, употребом тестног система са неограниченим бројем тестних тачака. Овом методом је одређена нумеричка, волуменска, површинска и специфична површинска густина пуних и празних инсулинских гранула, ендоплазматичног ретикулума, митохондрија, еухороматина и хетерохроматина бета ћелија.

Сви бројчани резултати добијени линеарним мјерењем и стереолошком анализом су приказани као средње вијердности, а сигнификантност разлика између испитиваних параметара ендокриног панкреаса зрачених и контролних животиња анализирана је адекватним статистичким тестовима ANOVA, MANOVA, и дискриминативном анализом. Постојање и ниво разлике између средњих вијердности испитиваних параметара међу посматраним групама анализирана је F-тестом и t-тестом, а добијени резултати су прегледно приказани кроз одговарајуће табеле и графиконе.

- а) објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
- б) дати кратак увид у примјењени метод рада при чему је важно оцјенити сљедеће:
- в) да ли су примјењене методе адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
- г) да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
- д) да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;
- е) да ли је статистичка обрада података адекватна;
- ж) да ли су добивени резултати јасно приказани;

4. РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

Према резултатима изнијетим у овој тези излагање пацова ВФ ЕМП условило је знатне квалитативне и квантитативне промјене ендокриног панкреаса. Показано је да је под утицајем ових поља дошло до повећања волуменске густине ендокрине компоненте панкреаса тј. Лангерхансових острва, што је резултат увећања броја острва, увећања броја појединих његових ендокриних ћелија, као и увећања волумена везивног ткива и крвних

капилара у острвима. Поред тога, код животиња излаганих ВФ ЕМП дошло је до промјене распореда острва унутар лобулуса панкреаса, као и промјене дистрибуције острва у односу на величину дијаметра. На пресецима панкреаса контролних пацова Лангерхансова острва су имала изглед овалних или округлих структура, расијаних у егзокрином панкреасу, чији се дијаметар кретао између 25 μm и 410 μm , а дистрибуција острва код ових животиња показује одређену правилност тако да, што су острва мања то им је положај у лобулусу перифернији. Мала острва (дијаметар < 118 μm) смјештена су периферно у лобулусима и она су најбројнија, острва средње величине (160 μm -260 μm) су се налазила дуж већих интралобуларних крвних судова, а највећа (>260 μm) су смјештена уз велике крвне судове и на мјестима гранања већих изводних канала егзокриног панкреаса. На пресецима панкреаса животиња које су боравили у ВФ ЕМП, међутим, може се запазит периферна локализација великих острва и сасвим друкчија дистрибуција острва у односу на дужину дијаметра. И овдје је највише острва чији је дијаметар класе од 80 μm до 120 μm , као код контроле, али се запажа пораст броја средњих и великих острва, односно острва чији је дијаметар у класи од 240 μm до 280 μm и у класи 400 μm до 440 μm , односно оних који се уопште не јављају код контролне групе животиња. Пад броја острва код излаганих животиња у односу на контролу запажен је код острва чији је дијаметар у класи од 200 μm до 240 μm и 360 μm до 400 μm .

Под утицајем ВФ ЕМП дошло је и до повећања волуменске густине везива и крвних капилара у Лангерхансовим острвима у односу на контролну групу. Повећање волуменске густине везива је било статистички значајно, док повећање волуменске густине капилара није статистички значајно, али овај налаз показује тренд ка увећању волумена ових крвних судова што је од значаја будући да боља прокрвљеност повећава функционалност ендокриних ћелија (алфа, бета, ПП и Д ћелија) острва.

Алфа ћелије Лангерхансових острва на излагање ВФ ЕМП су реаговале увећањем волуменске густине, што је узроковано значајним повећањем њиховог броја, тако да је број алфа ћелија повећан са 14,51, колики је био код контролних животиња у просјеку по пресеку острва, на 25, 83. Међутим, ово је било пређено несигнификантним смањењем површинске густине ових ћелија код животиња излаганих ВФ ЕМП. Повећање броја, а смањење површина алфа ћелија може указати на њихову повећану диобу и повећану активност у синтези/секрецију глукагона, што би било у складу са ранијим подацима о повећаном нивоу глукозе у крви као посљедици излагања ВФ ЕМП. О повећаној активности ових ћелија под утицајем ВФ ЕМП говори и њихова повећана имунореактивност, као и највеће повећање нуклеоцитоплазматског односа у односу на све остале испитиване ендокрине ћелије острва.

Бета ћелије Лангерхансових острва су на излагање ВФ ЕМП реаговале порастом волуменске густине и порастом броја, тако да је он код ових животиња у просјеку по пресеку острва износио 34,6 ћелија, док је код контролних животиња он био 19,8 ћелија, што је било статистички значајно повећање. Истовремено, код животиња које су боравиле у ВФ ЕМП била је статистички значајно смањена површина ових ћелија у односу на контролу. Ово је било праћено повећањем нуклеоцитоплазматског односа у бета ћелијама који се са 0,30, колико је износио код контроле, повећао на 0,33 код животиња које су боравиле у ВФ ЕМП. Увећан број бета ћелија уз истовремено смањење њихове површине после дјеловања ВФ ЕМП, како је установљено у овом експерименту, указује на њихову брзу пролиферацију, због чега ћелије нису могле да достигну своју оптималну величину. Имуноцитохемијским бојењем је показано да се јавља јаче просвјетљење централних бета ћелија у Лангерхансовим острвима

животиња које су излагане ВФ ЕМП у односу на контролу, што указује на повећану количину инсулина у њима. Овакав резултат може указати или на поремећај у секрецији инсулина или на његову веома брзу синтезу, услјед чега долази до нагомилавање инсулинских гранула унутар ћелија.

Д ћелије Лангерхансових острва на утицај ВФ ЕМП реагују такође повећањем броја, али ово повећање није било статистички значајно. Волуменска густина ових ћелија и њихова површина били су статистички значајно смањени код излаганих животиња у односу на контролне животиње. Њихов нуклеоцитоплазматски однос показује статистички значајан пораст код животиња које су боравиле у пољу у односу на контролу. Поред тога, уочена је и јача имуна реакција ових ћелија у свим острвима животиња које су биле излагане ВФ ЕМП у односу на контролу.

ПП ћелије Лангерхансових острва под дејством ВФ ЕМП су статистички значајно смањиле волуменску густину у односу на контролу, а такође је дошло и до смањења, премда не статистички сигнификантно, њиховог броја, као и површинске густине. Међутим, статистички значајно повећање нуклеоцитоплазматичног однос у овим ћелијама код животиња излаганих ВФ ЕМП показује њихову реактивност на ова поља.

Посебна пажња је посвећена ултраструктурној анализа бета ћелија ендокриног панкреаса будући да оне стоје у жижи интересовања стручне јавности обзиром на литературне податке који указују на могућу везу између излагања становништва електромагнетним пољима и све учесталије појаве дијабетеса. У цитоплазми бета ћелија животиња које су излагане ВФ ЕМП број пуних инсулинских гранула се удвостручио, а празних учетворостручио у односу на контролу. Истовремено је у овим ћелијама дошло и до повећања волуменске и површинске густине пуних и празних инсулинских гранула, што све указује на повећану активност ових ћелија, како у синтези тако и у секрецији инсулина под утицајем ВФ ЕМП. Ово је у сагласности са литературним подацима који указују да је функционална зрелост инсулинских гранула уједно и одраз степена диференцијације бета ћелија. Незреле и слабо развијене бета ћелије имају слабо развијене инсулинске грануле. Овдје треба такође истаћи и да се специфична површинска густина празних инсулинских гранула повећала код животиња које су излагане ВФ ЕМП у односу на контролу. Ранија истраживања су показала да код већих и старијих бета ћелија долази и до већег пораста специфичне површинске густине празних и пуних инсулинских гранула, што, генерално гледајући, може указивати на промјену облика ових гранула са сазријевањем и старењем бета ћелија.

Анализа волуменске густине митохондрија у бета ћелијама показала је да код животиња које су боравиле у ВФ ЕМП не долази до њене промјене у односу на контролу, али долази до пада површинске а пораста нумеричке густине ових органела. Пад вриједности површинске густине митохондрија бета ћелија говори о високој специјализацији ових ћелија и њиховој повећаној активности у синтези инсулинских гранула. Ови резултати су компатибилни са резултатима радова у којима аутори наводе да се пад вриједности површинске густине митохондрија бета ћелија огледа у њиховој специјализацији, односно да бета ћелије смањују површину митохондрија на рачун повећања површине ендоплазматичног ретикулума или инсулинских гранула. О повећаној активности бета ћелија у овим експерименталним условима додатно говори и повећање волуменске и површинске густине, како гранулисаног ендоплазматског ретикулума тако и еухроматина у

њиховим једрима.

Сумирајући ове резултате може се закључити да је боравак експерименталних животиња у ВФ ЕМП (1,9 ГХз, 4,79 В/м, 0,24 А/м, 0,2 W/m²) у трајању од 30 дана узроковао морфолошке и морфометријске промјене Лангерхансових острва и свих његових ћелија. Од ћелија ових острва најреактивније на ово поље су биле алфа ћелије. Пошто расте глукагон, хормон којег оне луче и који има супротно дјеловање од инсулина и повећава ниво глукозе у крви, резултати овог рада указују на могуће дијабетогено дјеловање ВФ ЕМП код пацова, а са тим у вези може да буде и статистички сигнификантан пад тјелесне масе који је констатован код животиња излаганих овим пољима. Међутим, ултраструктурна анализа бета ћелија показује да се и ове ћелије активирају под утицајем ВФ ЕМП, што можемо сматрати адаптивним одговором на повећану активност алфа ћелија која има за последицу повећану синтезу и секрецију дијабетогеног хормона глукагона.

Добијени резултати у овој докторској дисертацији дају значајан прилог проучавању утицаја ВФ ЕМП на структурне карактеристике ендокриног панкреаса, што са једне стране има фундаментални значај јер доприноси сагледавању ефеката ВФ ЕМП на живе системе али и апликативни, јер могу допринијети у изради протокола који се баве заштитом најшире популације од утицаја ВФ ЕМП. Поред тога, добијени резултати су добра основа за даља истраживања, прије свега молекуларних механизма интеракције ВФ ЕМП и ендокриних ћелија панкреаса.

- а) Укратко навести резултате до којих је кандидат дошао;
- б) Оцијенити да ли су добивени резултати правилно, логично и јасно тумачени, упоређујући са резултатима других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;
- в) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

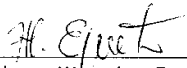
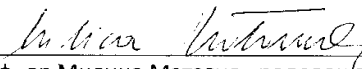
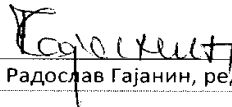
5. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Мр Смиљана Параш је испитујући утицај високофреквентног електромагнетног поља (1,9 GHz, 4,79 V/m, 0,24 A/m, 2,0 W/m²) на ендокрини панкреас у овој докторској дисертацији детаљно обрадила једну веома актуелну тему. Рационално је анализирали велики број параметара релевантних за процјену структурних промјена ендокриног панкреаса, а резултати ове анализе су успјешно систематизовани у логичке цјелине и прегледно презентовани кроз бројне оригиналне фотографије, графиконе и табеле. Резултати су такође детаљно продискутовани и критички упоређивани са резултатима из цитиране литературе. Све ово је омогућило доношење јасних закључака који иду у прилог дијабетогеном деловању ВФ ЕМП, што представља значајан допринос у изучавању ефеката ових поља на ендокрину компоненту панкреаса. На основу наведеног Комисија сматра да ова докторска дисертација представља оригиналан научни допринос и једногласно предлаже Научно-наставном вијећу Природно-математичког факултета Универзитета у Бањој Луци да се докторска дисертација **мр Смиљане Параш "Морфолошке и ултраструктурне промене**

ендокриног панкреаса пацова Wistar соја под утицајем високофреквентних електромагнетних поља“ прихвати, а кандидату одобри одбрана овог рада.

- а) Навести најзначајније чињенице што тези даје научну вриједност, ако исте постоје дати позитивну вриједност самој тези;
- б) Ако је приједлог негативан, треба дати опширније образложење и документовано указати на учињене пропусте, односно недостатке написане докторске тезе.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

1. 
Проф. др Живојин Ерић, редован проф., предсједник
2. 
Проф. др Милица Матавуљ, редован проф., ментор
3. 
Проф. др Радослав Гајанин, редован проф., члан