

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 08.04.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Дуње Дракулић и проф. др Горана Брајушковића о урађеној докторској дисертацији **Ане Валенте Шобот**, вишег стручног сарадника Института за нуклеарне науке „Винча“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, Београд, Република Србија, под насловом „**Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу моноклеарних ћелија периферне крви човека**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. **др Јелена Лозо**, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет
2. **др Ива Лакић**, доцент, Универзитет у Београду - Биолошки факултет
3. **др Јелена Филиповић Тричковић**, научни сарадник, Институт за нуклеарне науке „Винча“ - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Ане Валенте Шобот** под насловом „**Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу моноклеарних ћелија периферне крви човека**“ садржи следеће делове: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима Комисије, Захвалницу, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област и Ужа научна област), Листу скраћеница, Садржај и текст дисертације по одговарајућим поглављима, као и прилоге: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије дисертације и Изјаву о коришћењу. Докторска дисертација написана је на **68 страна** куцаног текста прореда 1, величине слова 12 пт, садржи **23 слике**, **13 табела**, **239 литературних цитата**, и подељена је у седам поглавља: **УВОД** (12 страна), **ЦИЉ РАДА** (1 страна), **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** (11 страна), **РЕЗУЛТАТИ** (18 страна), **ДИСКУСИЈА** (12 страна), **ЗАКЉУЧАК** (1 страна) и **ЛИТЕРАТУРА** (13 страна).

Полазне основе истраживања обухваћених овом тезом

Gentiana lutea је лековита биљка чији се корен традиционално користи за ублажавање гастроинтестиналних сметњи, болести јетре, процеса инфламације и подстицање циркулације. Научна испитивања су у многим аспектима потврдила основаност традиционалне примене препарата *G. lutea*, стога се у савременој медицини користе производи попут сушеног корена линцуре, капи линцуре, и друго. Управо, сушени корен *G. lutea* се користи за прављење чајних мешавина, на пример за побољшање апетита, надокнађивање мањка желудачне киселине, јачање отпорности и против упале вена. Екстракт корена *G. lutea* (ЕКГ) улази у састав капи за срце, апетит и бољу циркулацију. Показано је да ЕКГ штити мукозу желуца од лезија изазване етанолом и аспирином, као и да испољава инхибиторни ефекат на грам-негативне сојеве бактерија *Helicobacter pylori* која је основни етиолошки фактор настанка гастритиса и чира. Осим тога, утиче и на васкуларни тонус крвних судова дигестивног тракта, смањује акумулацију липида на зидовима крвних судова и утиче на факторе укључене у атеросклерозу, штитећи на тај начин крвне судове.

Лековита својства ЕКГ и биљака које синтетишу сличне секундарне метаболите приписују се горким компонентама, иридоидима и секоиридоидим, који су најзаступљенији секундарни метаболити у корену *G. lutea* (2–8%), као и флавоноидима и ксантонима. Најзаступљенији иридоид је логанска киселина, а од секоиридоида: генциопикрозид, свртиамарин и сверозид, који сви припадају групи монотерпенских једињења (МРК). Литературни подаци указују да ова једињења утичу на смањење инфламације, активирају антиоксидативне одбране, чиме испољавају протективни утицај на ћелијско преживљавање у присуству токсичних агенаса.

Иако бројна истраживања указују на оправданост примене биљних препарата *G. lutea*, запажено је и да поједине активне компоненте присутне у корену биљке могу изазвати оксидативни и генотоксични стрес, нарушити процес пролиферације ћелија модулацијом ћелијског циклуса и/или активирати ћелијску смрт, и друго. Потврђено је да ЕКГ и генциопикрозид могу испољити и генотоксични утицај. Цитотоксичност ЕКГ и МРК је, до сада, најчешће потврђена на туморским ћелијским линијама. Цитотоксични утицај генциопикрозида, сверозида и свртиамарина, доказан је на туморским ћелијским линијама уз активацију каспазно-зависне апоптозе, померањем ћелијског баланса ка проапототским молекулима. Такође, подаци добијени *in silico* анализом показали су да се између протеина Bcl 2 и наведених МРК, могу формирати комплекси који утичу на смањење нивоа овог антиапоптотског протеина и тиме на могућност директне интеракције са молекулима укљученим у регулацију апоптозе која би могла условити њено селективно активирање. Програмирани типови ћелијске смрти, апоптоза и некроптоза, иако се знатно разликују по променама које се дешавају на нивоу ћелије, имају заједничке контролне учеснике. Молекули са селективним утицајем на активацију/инхибицију једног од механизма ћелијске смрти, без значајног утицаја на друге типове ћелијске смрти, могу бити значајни у процесима развијања терапеутика. Инхибитори каспаза, на пример, могу имати улогу у третману патолошких стања повезаним са акутним повредама ткива које карактерише прекомерна апоптоза, као што су мождани удар и инфаркт миокарда. С друге стране, активација учесника у регулаторној каскади апоптозе могла би наћи примену и у терапији малигних болести

код којих је услед мутација или аберантне експресије регулаторних молекула блокирана могућност активације апоптозе. Укрштање регулаторних каскада различитих типова ћелијске смрти услед учешћа истих молекула, отвара могућност преласка са једног на други тип ћелијске смрти када је један од сигналних путева блокиран, чиме може бити ограничена селективност третмана у активирању једног типа ћелијске смрти. Овакав начин модулисања ћелијске смрти, такође, може имати терапијску примену. Активација некроптозе туморских ћелија код којих услед измењених регулаторних молекула није могуће покретање апоптозе, сем антутуморског утицаја, додатно ослобађањем молекуларних образаца повезаних са оштећењем ћелија (eng. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs) може утицати на имуни систем и промовисати сузбијање тумора.

Иако су због природног порекла и дугогодишње примене у традиционалној медицини сматрани безбедним за коришћење, конзумација биљних лековитих производа може довести до нежељених дејства, поред осталог, и услед неадекватног начина припреме и примене. Бројна истраживања указала су на позитиван утицај ЕКГ и/или МРК када су коришћени у присуству токсичног агенса, као и на њихове антитуморске утицаје услед активације апоптозе, док је мали број студија био усмерен на проучавање њихових утицаја у неизмењеним ћелијама. С обзиром да биљни екстракти и њихове активне компоненте могу модулисати унутарћелијске процесе у патолошким стањима, идентификација компоненти које могу утицати на механизам регулисане ћелијске смрти у неоштећеним ћелијама може бити од велике важности у процени безбедности њихове примене, као и креирању потенцијалних фитофармацеутика.

Анализа докторске дисертације

Докторска дисертација обухвата седам уобичајених поглавља.

Прво поглавље, **УВОД**, подељено је у **шест целина** и садржи **шест илустрација** и **једну табелу**. У оквиру **прве целине**, кандидаткиња је пружила увид о употреби лековитог биља у савременој медицини. У **другој целини**, дат је преглед традиционалне употребе лековите биљке *Gentiana lutea* у медицинске сврхе, географске распрострањеност рода у Европи и подврста у Републици Србији, морфолошких карактеристика биљке као и преглед и потрошња тренутно присутних препарата у чији састав улазе делови наведене лековите биљке и/или екстракти. Додатно је на **Слици 1** представљена биљка у природном станишту и сушени корен биљке, У **трећој целини**, истакнуте су групе једињења присутне у корену биљке *G. lutea*, са освртом на најчешће идентификоване секундарне метаболите корена, иридоид - логанску киселину и секоиридоиде - генциопикрозид, сверозид и свртиамарин. У овом делу представљени су и пут синтезе иридоида и секоиридоида на **Слици 2**, као и молекулске формуле испитиваних монотерпенских једињења на **Слици 3**. У **четвртој целини** описан је пут анализе комплетних биљних екстраката, као и испитивање појединачних једињења, додатно шематски представљени на **Слици 4**, са освртом на сигурност примене и процену њихове употребе као фитофармацеутика. **Четврта целина** се састоји од **три подцелине** у којима су описани цитотоксичност, генотоксичност и оксидативни стрес, редом, који могу настати под утицајем ксенобиотика. У оквиру **пете целине** концизно су описани типови ћелијске смрти, регулација апоптозе која је и приказана на

Слици 5, некроптозе праћена **Сликом 6**, други типови регулисаних начина ћелијске смрти, који су представљени у оквиру **Табеле 1**, као и модулисање путева ћелијске смрти. **Шесту целину** чини преглед до сада познатих утицаја ЕКГ и МРК, са освртом на њихов до сада уочени цитотоксични и генотоксични утицај који је дат у оквиру посебног поднаслоа.

У делу **ЦИЉ РАДА**, наведен је и образложен научни циљ докторске дисертације - процена одговора моноклеарних ћелија периферне крви човека (ПБМЦ) и култура ПБМЦ стимулираних на деобу фитохемаглутинином (ПХА) (ПХА-ПБМЦ) при излагању цитотоксичним концентрацијама МРК и ЕКГ, као и идентификација ћелијске смрти апоптозе и некроптозе изазване утицајем третмана и процена селективне активације испитиваних типова ћелијске смрти. Додатно је, у складу са основним циљем, дефинисано седам појединачних циљева: 1) припрема ЕКГ; квалитативна и квантитативна анализа МРК у ЕКГ и провера стабилности МРК и ЕКГ у *in vitro* условима; 2) оптимизација дужине трајања и концентрације ЕКГ третмана који утичу на стопу ћелијског преживљавања; 3) *in silico* процена биоактивности МРК; 4) *in vitro* процена генотоксичног утицаја МРК и ЕКГ третмана; 5) провера утицаја МРК и ЕКГ третмана на одабране параметре оксидативног стреса; 6) испитивање морфолошких карактеристика ћелија након третмана, као и нивоа протеина укључених у регулацију ћелијске смрти типа апоптозе и некроптозе; 7) процена утицаја третмана на селективно активирање ћелијске смрти типа апоптозе и некроптозе у присуству специфичних инхибитора.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ** подељено је у **две целине**. У оквиру **прве целине МАТЕРИЈАЛИ** описано је узорковање биолошког материјала коришћеног у даљим експериментима, који су у складу са препорукама Етичког комитета Института за нуклеарне науке „Винча” - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, као и хемикалије коришћене за потребе ове експерименталне поставке представљене у **Табели 2** и антитела коришћена у имуноблот анализама у **Табели 3**. **Друга целина, МЕТОДЕ**, обухвата експерименталне протоколе и методолошке приступе које је кандидаткиња користила у својим истраживањима, подељена је на **9 подцелина** и садржи **1 табелу**. У **првој подцелини**, детаљно је описана припрема ЕКГ, док је у **другој подцелини** описана методологија коришћена при карактеризацији ЕКГ која укључује: 1) морфолошку анализу ЕКГ коришћењем сканирајуће електронске микроскопије; 2) квалитативну и квантитативну анализу МРК у ЕКГ; 3) анализу стабилности МРК у комплетном медијуму РПМИ. **Трећа подцелина** обухвата опис изоловања, култивације ПБМЦ и примену третмана култура која је праћена табеларним приказом група третмана у присуству инхибитора (**Табела 4**). Даље је у **четвртој подцелини** описана методологија испитивања цитотоксичног утицаја третмана ЕКГ и МРК, која обухвата: 1) испитивање вијабилности ћелија процедуром по Строберу; 2) испитивање вијабилности ћелија коришћењем ХТТ теста; 3) анализу ћелијског циклуса методом проточне цитофлуориметрије. У **петој подцелини**, кандидаткиња описује поступак процене генотоксичног утицаја третмана ЕКГ и МРК, који укључује: 1) *in silico* анализу генотоксичности одабраних МРК; 2) испитивање оштећења у молекулу ДНК коришћењем алкалног комет есеја; 3) детекцију микронуклеуса коришћењем микронуклеусног теста; 4) анализу хромозомских аберација. У **шестој подцелини**, детаљно су приказане примењене биохемијске анализе којима су испитивани нивои параметара оксидативног стреса, укључујући прооксидативни/антиоксидативни баланс (ПАБ), продуката липидне пероксидације (ЛПП) и 8-оксо-7,8-дихидро-2-деоксигуанозина (8-oxodG). У **седмој подцелини** су описане методе за испитивање типа ћелијске смрти након примењених третмана, као

што су фрагментација молекула ДНК коришћењем колориметријског ДНК фрагментационог есеја и морфолошка анализа ћелија помоћу флуоресцентног ТМРЕ/ДАПИ бојења. **Осма подцелина** укључује опис имуноблот анализе нивоа протеина кључних за апоптозу и некроптозу, чему предходи опис процедуре припреме узорака и одређивање концентрације протеина по Lowry методи. На крају овог поглавља, у оквиру **девете подцелине**, назначена је статистичка анализа коришћена при обради добијених експерименталних резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ**, написано на 18 страна, подељено је у **5 целина**, а добијени резултати су представљени на **17 слика** и у **9 табела**. **Прва целина** се састоји од **две подцелине** у којима су редом приказани су резултати морфолошке (**Слика 7.**) и квалитативне и квантитативне анализе ЕКГ. У **првој подцелини** резултати су указали да се лиофилизацијом воденог екстракта добијају агрегати већих димензија од почетних честица праха, који су високо растворни у 50% етанолу. У **другој подцелини** на **Сликама 8. и 9.**, показана је присутност свих испитиваних МРК, док је квантитативном анализом, показано да су све испитиване МРК присутне у високим концентрацијама а посебно генциопикрозид (**Табела 5.**). Стабилност МРК је потврђена квантитативном анализом медијума након излагања експерименталним условима примењеним у овој докторској дисертацији.су чији резултати представљени у **Табелама 6. и на Слици 10.** **Друга целина** представља резултате оптимизације услова третмана, односно дужине експозиције и концентрације ЕКГ и МРК третмана, који не смањују стопу ћелијског преживљавања за више од 30%. На основу процене ћелијског преживљавања и анализе хромозомских аберација, након 48 и 72 сата третмана концентрацијама од 0.5, 1 и 2 mg/mL (**Табела 7.**), а да би се смањило утицај опоравка ћелија услед активирања механизма поправке оштећених молекула ДНК (**Слика 11.**), одабрано је време излагања третманима од 48 сати. С обзиром да вредности нивоа ПАБ и ЛПП, нису биле измењене након 48 сати ЕКГ третмана култура ПБМЦ (**Табела 8.**) након третмана концентрацијама са значајним цитотоксичним потенцијалом, за даље третмане одабрана је концентрација 1 mg/mL ЕКГ која значајно смањује број ћелија након 48 сати третмана и има мањи генотоксични потенцијал. Резултати ћелијског преживљавања култура ПБМЦ након 48 сати МРК третмана опсегом концентрација од 20 до 130 μM , показали су да концентрација од 50 μM за третмане МРК, смањује стопу ћелијског преживљавања у претходно дефинисаним оквирима (**Слика 12.**). У **трећој целини**, у **пет подцелина**, представљени су резултати процене биолошког утицаја МРК и ЕКГ на културе ПБМЦ и ПХА-ПБМЦ. У **првој подцелини**, на **Слици 13.** и у **Табели 9.**, представљени су резултати *in silico* анализе канцерогеног и мутагеног потенцијала одабраних МРК, који су указали са умереном до високом поузданошћу процене, да ови молекули имају у себи фрагменте, означене као структурна упозорења (СА), која су идентификована и у доказаним канцерогенима. У **другој подцелини** представљени резултати испитивања цитотоксичног и генотоксичног утицаја МРК и ЕКГ, сумирани у **Табели 10.**, показали су да цитотоксичне концентрације утичу на повећање фрагментације молекула ДНК, што може представљати показатељ покренуте каспазно-зависне апоптозе. Додатне анализе утицаја генотоксичности испитиваних третмана у обе културе, су потврдиле да након 48 сати код култура ПБМЦ, третмани са 50 μM МРК и 1 mg/mL ЕКГ, као и 50 μM МРК код култура ПХА-ПБМЦ, испољавају генотоксични потенцијал (**Слике 14. и 15.**). У **трећој подцелини** су на **Слици 16.** приказани резултати процене утицаја МРК и ЕКГ на фазе ћелијског циклуса култура ПХА-ПБМЦ, који су указали да након МРК третмана, долази до повећања броја ћелија у S фази ћелијског циклуса. У следећој **подцелини** представљени су резултати утицаја МРК и ЕКГ на параметре оксидативног стреса чиме је показано да на повећање оксидативног стреса утиче генциопикрозид након третмана култура ПБМЦ, док је

оксидативно оштећење молекула ДНК праћено преко 8-oxodG, смањено након свих цитотоксичних третмана у обе културе (**Табела 11.**). Анализа морфолошких карактеристика ћелијске смрти након МРК и ЕКГ третмана, приказана на **Слици 17.**, у **петој подцелини** указала је на појаву ћелија са карактеристикама касне апоптозе, као и ћелија са измењеном пропустљивошћу мембране која указује на ћелијску смрт различиту од апоптозе. У **четвртој целини** представљени су резултати имуноблот анализе протеина укључених у регулацију ћелијске смрти типа апоптозе и некроптозе: ERK1/2 (тотал и фосфоформа, **Слика 18.**), Вах i Bcl 2 и њиховог међусобног односа (**Слика 19.**), прокаспазе 3 и сечене форме каспазе 3 (**Слика 20.**), PARP 1 (116 kDa и 89 kDa, **Слика 21.**), и MLKL (тотал и фосфо форма, **Слика 22.**), који указују да у овој експерименталној поставци сви третмани могу утицати на активирање апоптотске сигналне каскаде, док третман свертиамарином и генциопикрозидом у културама ПБМЦ, као и третман свертиамарином у културама ПХА-ПБМЦ, стварају услове у којима се може покренути некроптоза. У **петој целини** која је подељена у **две подцелине** представљени су резултати испитивања селективног утицаја МРК и ЕКГ третмана на активацију ћелијске смрти типа апоптозе и некроптозе. У **првој подцелини** резултати ћелијског преживљавања након МРК и ЕКГ третмана у присуству инхибитора ћелијске смрти некроптозе-некростатина 1 (нец) и пан-каспазног инхибитора zvad-fmk (звад), представљени у **Табелама 12.** и **13.**, указали су на могуће одсуство специфичне интеракције МРК и ЕКГ са испитиваним сигналним молекула укљученим у регулацију апоптозе и некроптозе којом би се утицало на њихову селективну активацију, као и да оштећене ћелије умиру другим типом ћелијске смрти који није блокиран. Стога су у **другој подцелини** испитиване промене у нивоу експресије протеина укључених у завршне кораке регулације ћелијске смрти типа некроптозе и апоптозе (MLKL, каспаза 3 и PARP 1), у котретманима генциопикрозида/свертиамарина са нец/звад/оба инхибитора. Резултати престављени на **Слици 23.** показују да примењени третмани у обе ћелијске културе стварају услове за активацију апоптозе и некроптозе, док присуство инхибитора фаворизује ћелијску смрт која није блокирана.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, критички су анализирани представљени експериментални резултати и интрепретирани су у складу са релевантним литературним подацима. Показано је да ЕКГ поседује високи садржај МРК поготову генциопикрозид, што је у складу са другим истраживањима. Показана стабилност МРК је у складу са краткотрајним излагањем МРК одабраним експерименталним условима *in vitro*. Објашњена је потреба за оптимизацијом услова третмана с обзиром да су претходна *in vitro* испитивања утицаја ЕКГ показала значајније разлике у ћелијском одговору услед разлике у испитиваним концентрацијама и времена излагања третману. Одабрани услови третмана су у складу са постављеним циљевима ове експерименталне поставке и у оквиру су литературно показаних вредности. Литературни подаци су указали да примењене методе испитивања генотоксичног потенцијала корелишу, и не зависе од врсте ћелија на којима је рађено испитивање, чиме је оправдано коришћење различитих тестова за испитивање генотоксичности, којима је показан генотоксични потенцијал ЕКГ. Такође је детаљним прегледом литературних података показано да уочени изостанак промене испитиваних параметара оксидативног стреса након ЕКГ третмана може настати услед одбрамбеног ћелијског одговора, као и услед паралелног повећања концентрације флавоноида и ксантона који су према литератури једињења која у ЕКГ имају способност уклањања слободних радикала.

Прегледом литературе установљено је да резултати добијени *in silico* анализом указују да је могућа основа генотоксичног потенцијала МРК присуство СА, чија

електрофилност омогућава интеракцију са нуклеофилним регионима нуклеотида. СА са два електрофилна центра у СА 76 – који је присутан у свим МРК и СА 13 у генциопикрозиду, карактерише молекуларна основа која може довести до формирања унакрсних веза између ланаца ДНК у интеракцији са два наспрамна нуклеотида у молекулу ДНК. Уочене разлике у врсти и броју СА у МРК могу утицати на различити ниво генотоксичног потенцијала, али се могу одразити и на друге видове биоактивности. Блажи утицај ЕКГ у односу на МРК, који се уочава поређењем ћелијског преживљавања у два различита типа култура истог порекла, је вероватно настао услед присуства и других фитохемикалија осим детектованих МРК. Кандидаткиња истиче да су представљени резултати који указују на разлику у ћелијском преживљавању култура, фрагментацији молекула ДНК, као и одговору на генотоксична оштећења након третмана култура ПБМЦ и ПХА-ПБМЦ, у складу са познатим подацима и да су последица одговора ћелија који зависи и од карактеристика ћелијске културе. Утицај примењених третмана на ћелијски циклус култура ПХА-ПБМЦ је такође у складу са литературним подацима који указују да третман ЕКГ и МРК могу утицати на заустављања ћелијског циклуса туморских ћелија и да продужење S фазе ћелијског циклуса вероватно настаје услед покретања процеса поправке оштећења молекула ДНК од којих су документована хомолога рекомбинација након ЕКГ третмана у експериментима оптимизације услова третмана. Анализа нивоа ПАБ и ЛПП показује да генциопикрозид може утицати на њихово повећање након третмана култура ПБМЦ, уз осврт да ово једињење карактерише и највећи број СА који могу бити разлог показаних утицаја. Смањење нивоа 8-oxodG које је уочено након свих третмана у културама ПБМЦ и МРК третмана у културама ПХА-ПБМЦ, указује на активност механизма базне ексцизионе поправке, док би додатне анализе дефинисале тачну улогу третмана на испитиване параметре оксидативног стреса у задатим експерименталним условима.

Анализом резултата нивоа протеина укључених у регулацију апоптозе и некроптозе кандидаткиња истиче да је процес ћелијске смрти настао применом третмана каспазно-зависна апоптоза, с обзиром на детектовано померање равнотеже протеина Вах/Bcl 2 ка проапоптотском протеину Вах, сечених фрагмената каспазе 3 и PARP 1. Истакнуто је да промена нивоа активне форме ERK1/2, који може учествовати у регулацији различитих типова ћелијске смрти, у примењеним експерименталним условима прати образац промене који је у литератури показан након излагања ћелија генотоксичним агенсима, када се услед већих оштећења молекула ДНК активира каспазно-зависна апоптоза. Активирање каспазно-зависне апоптозе је очекивани резултат ове докторске тезе у односу на литературне податке и претходно добијене резултате генотоксичности коју су изазвали цитотоксични третмани. Поред апоптозе, третмани култура ПБМЦ са свертиамином и генциопикрозидом су створили услове за активирање некроптозе. Кандидаткиња је посебну пажњу посветила прегледу литературе у изналажењу одговора на промене у ћелији који могу утицати на активирање овог типа ћелијске смрти и додатно истиче да промене које су уочене морфолошком анализом ћелија након третмана, као и уоченог пада вредности 8-oxodG могу бити повезане и са другим типом ћелијске смрти - партанатозом, који није био предмет њеног истраживачког рада. Даље проучавање утицаја третмана на могуће селективно активирање ћелијске смрти је рађено у присуству инхибитора, који у котретманима са МРК и ЕКГ нису утицали на повећање ћелијског преживљавања у односу на одговарајућу контролу, док је уочена разлика након третмана генциопикрозидом и свертиамином у третману са оба инхибитора када ћелије боље преживљавају у поређењу са овим третманима без инхибитора. Кандидаткиња је претпоставила да присуство једног инхибитора фаворизује ћелијско умирање неблокираним типом ћелијске смрти, што је и показала

анализом нивоа протеина који су кључни за апоптозу и некроптозу. Добијени резултати су у складу са литературом која указује да у присуству инхибитора једног типа ћелијске смрти, услед заједничких учесника у регулаторним сигналним каскадама може фаворизовати неблокирани тип ћелијског умирања. Додатно је на овај начин кандидаткиња потврдила да третмани не показују селективност у активирању каспазно-зависне апоптозе, јер се оштећене ћелије уклањају и другим типом/типovima ћелијске смрти и у присуству оба инхибитора. Истакнуто је да генотоксични потенцијал МРК, као и могућност активирања регулисане ћелијске смрти, показани у овој експерименталној поставци, указују да би при потенцијалној примени МРК као фитофармацеутика у вишим концентрацијама, третмани могли имати утицај паралелно и на оштећење неизмењених ћелија. Посебно је наглашено да резултати ове докторске дисертације не оспоравају благотворно дејство ЕКГ примењеног у мањим дозама и у краћем временском периоду, већ да неадекватна припрема и примена лако доступног биљног препарата може имати и штетне последице.

У поглављу **ЗАКЉУЧАК** концизно су сумирани појединачни закључци на основу добијених резултата. Кандидаткиња истиче да су уочени цитотоксични и генотоксични утицаји ЕКГ условљени концентрацијом и временом изложености третману, као и карактеристикама ћелијске културе. Такође, закључено је да цитотоксични утицај МРК настаје услед генотоксичних оштећења и неселективним активирањем каспазно-зависне апоптозе. Код појединих ћелија уочени губитак пермеабилности мембране може се повезати и са покретањем других типова регулисане ћелијске смрти, укључујући и некроптозу након третмана култура ПБМЦ са генциопикрозидом и свртиамарином. Ниво испитиваних протеина кључних за завршне кораке апоптозе и некроптозе, потврдили су да ови третмани у присуству инхибитора апоптозе и некроптозе задржавају цитотоксични потенцијал услед опредељења ћелија за неблокирани тип ћелијске смрти.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА**, дата је листа од 239 библиографских јединица, од чега 27% чине подаци објављени у периоду 2019. до 2021. године. Приказане научне публикације се односе на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су адекватно, тако да доприносе објашњењу и афирмацији добијених резултата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. M22 Ana Valenta Šobot, Dunja Drakulić, Gordana Joksić, Jadranka Miletić Vukajlović, Jasmina Savić, Jelena Potočnik, Jelena Filipović Tričković. Yellow gentian root extract provokes concentration- and time-dependent response in peripheral blood mononuclear cells. *Arh Hig Rada Toksikol* 2020;71:181-189.
M22 (IF: 1.727)
<https://hrcak.srce.hr/file/361056>
2. M23 Ana Valenta Šobot, Jasmina Savić, Jelena Filipović Tričković, Dunja Drakulić, Gordana Joksić. Toxicity assessment of *Gentiana lutea* L. Root extract and its monoterpene compounds. *Indian J Exp Biol* 2020;58:609–616.
M23 (IF: 0.818)
<http://op.niscair.res.in/index.php/IJEB/article/viewFile/39874/465477739>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. M34 Valenta Sobot A, Filipovic Trickovic J, Drakulic D, *Gentiana lutea* radix extract exerts *in vitro* dose- and time-dependent response in peripheral blood mononuclear cells. Book of abstract (ISBN 978-86-917867-1-7), 10 th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) and 12 th Congress of the Serbian Society of Toxicology (12 th SCT), 2018, Serbian Society of Toxicology, Beograd, Serbia, p 116

Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Ане Валента Шобот**, број индекса **Б3059/2010**, послата је 16.03.2022. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили 17.03.2022. године.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације Ане Валенте Шобот под насловом **„Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу моноклеарних ћелија периферне крви човека“**, утврђено је подударање текста од 11% уз искључена преклапања цитата и библиографских података о коришћеној литератури. Приликом анализе резултата провере оригиналности нису узети у обзир претходно публиковани резултати докторандових истраживања. Степен подударности последица је мањкавости софтвера (неадекватно искључивање библиографских података о коришћеној литератури), као и општих термина и података, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације под насловом **„Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу моноклеарних ћелија периферне крви човека“**, ауторке Ане Валенте Шобот, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

На основу анализе докторске дисертације кандидаткиље Ане Валенте Шобот под насловом „Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу моноклеарних ћелија периферне крви човека“, Комисија закључује да резултати представљају оригиналан допринос у разумевању утицаја ЕКГ и МРК на активирање ћелијске смрти услед њиховог генотоксичног утицаја. Имајући у виду да ЕКГ и његове активне компоненте могу модулисати унутарћелијске процесе у патолошким стањима, идентификација компоненти које могу утицати на механизам регулисане ћелијске смрти у неопштењеним ћелијама може бити од велике важности у процени безбедности њихове примене, као и креирању потенцијалних фитофармацеутика.

Чланови Комисије истичу да је кандидаткиња показала висок степен самосталности током израде докторске дисертације, као и да је на адекватан начин применила методе и приступе, али и интерпретирала добијене резултате у контексту постојеће литературе, што је допринело публикавању резултата ове тезе у релевантним међународним часописима. Поред публикација насталих израдом докторске дисертације, истичемо да је кандидаткиња у оквиру уже области истраживања, публиковала још 15 радова у међународним часописима и бројна саопштења на међународним и домаћим скуповима.

На основу увида у истраживања и постигнуте резултате, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиље Ане Валенте Шобот под насловом „Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу моноклеарних ћелија периферне крви човека“, и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

У Београду, 11.04.2022. године.

др Јелена Лозо, редовни професор,
Универзитет у Београду -
Биолошки факултет

др Ива Лакић, доцент,
Универзитет у Београду -
Биолошки факултет

др Јелена Филиповић Тричковић, научни сарадник,
Института за нуклеарне науке „Винча” -
Института од националног значаја за Републику Србију
Универзитета у Београду