

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.03.2018. godine, broj 5940/15, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Mehanizmi bioloških efekata jedinjenja dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina“

kandidata dr Jelene Martinov, zaposlenog u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog Centra Srbije, Beograd. Mentor je Prof. dr Miodrag Krstić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tomica Milosavljević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Tatjana Simić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragomir Damjanov, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Martinov napisana je na ukupno 126 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metodologija, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 31 slika i 3 tabele. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je naveden istorijat pektina. Opisana je biologija pektina uključujući strukturu ćelijskog zida biljaka. Navedena je hemijska struktura pektina sa predloženim modelima pektina kao i njegova hemijska svojstva. Takođe, navedeni su izvori pektina u hrani i komercijalni izvori, a opisana je ukratko i procedura ekstrakcije komercijalnog pektina. Na adekvatan način je u potpunosti opisana modifikacija pektina putem supstitucije, elongacije i depolimerizacije.

Takođe je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za upotrebu pektina u industriji kao i njegove fiziološke efekte na ljudski organizam. Opisana je uloga pektina kao dijetalnog vlakna, prebiotska uloga, imunomodulatorni efekat, detoksikacioni, hipoholesterolemijski i hipoglikemijski efekat, antioksidativna uloga, apoptoza i antitumorski efekat; i novije primene pektina kao inkapsulacionog sredstva, nosača oralnih lekova, njegova primena u regenerativnoj medicini. Detaljno je opisan jabučni pektin i njegovi zdravstveni benefiti. Potom, definisani su slobodni radikali sa posebnim osvrtom na slobodne radikale kiseonika, lipidnu peroksidaciju, antioksidativni zaštitni sistem sa njegovim enzimskim komponentama. Opisana je Fentonova reakcija i reaktanti u Fentonovoj reakciji.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se od dobijanja oligosaharida iz pektina jabuke i citrusa, kontrolisanom alkalnom hidrolizom uz primenu vodonik peroksida. Potom su nevedeni sledeći ciljevi rada- testiranje efekta dobijenih oligosaharida EPR spektroskopijom na hidroksidni radikal generisan Fentonovom reakcijom; određivanje antimikrobne aktivnosti pektina i derivata pektina (za *E. coli* i *S. aureus*) kao i testiranje efekata dobijenih oligosaharida na broj bakterija u kulturama *E. coli* i *S. aureus* u prisustvu Fenton potencirajućih suspcanci (Fe i vit C). Kao cilj rada navedeno je i određivanje promena koje su izazvali dobijeni oligosaharidi na sistemu zaštite od oksidacionih oštećenja preživelih bakterija (iz kultura *E. coli* i *S. aureus*). Takođe, kao cilj istraživanja je navedeno i testiranje efekta dobijenih derivata pektina jabuke na imuni sistem, na makrofagima i ćelijama limfnih čvorova vrata.

U poglavlju **materijal i metodologija** je navedeno da se radi o istraživanju koje je sprovedeno u saradnji sa istraživačima Instituta za multidisciplinarna istraživanja i Instituta za biološka istraživanja Univerziteta u Beogradu. Detaljno je opisan način hidrolize jabučnog i citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline, spektroskopija u infracrvenoj oblasti sa Furijeovom transformacijom kao i elektron paramagnetna rezonancija kojom je testirana reaktivnost na hidroksidni radikal generisan Fentonovom reakcijom. Za određivanje antimikrobne aktivnosti pektina i njegovih derivata korišćena je metoda difuzije u agaru, navedeni su korišćeni test mikroorganizmi i hranljive podloge. Detaljno je opisan i postupak kojim je testiran efekat dobijenih oligosaharida iz pektina jabuke i citrusa u prisustvu Fenton-potencirajućih supstanci na broj bakterija u kulturama *E. coli* i *S. aureus*. Takođe, detaljno su opisani postupci kojim su određene aktivnosti antioksidacionih enzima u *E. coli* i *S. aureus* i to određivanje aktivnosti katalaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze, Cu/Zn sadržavajuće superoksid dismutaze. Za potrebe testiranja derivata pektina na imuni sistem

opisana je priprema medijuma za gajenje ćelija, koje su eksperimentalne životinje korišćene, postupak izolovanja ćelija peritonealnog eksudata i ćelija cervikalnih limfnih čvorova. Takođe je opisan postupak brojanja ćelija, uspostavljanje kulture makrofaga i kulture ćelija cervikalnih limfnih čvorova. Eksperimenti su izvedeni u četiri jednaka primerka, u toku dva eksperimentalna dana.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 292 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

Alkalnom hidrolizom jabučnog, citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline, u prisustvu vodonik peroksida, dobijeni su proizvodi APDO, CPDO i PGDO. Dobijeni proizvod APDO okarakterisan je FTIR spektroskopijom i pokazano je da u odnosu na polazni materijal ima simetrične i asimetrične vibracije istezanja karboksilatnih grupa. Moguće je da dobijeni derivat ima specifične reakcije sa hidroksidnim radikalima koji nastaju u Fentonovoj reakciji (*in vitro* i *in vivo*). Analizom APDO, CPDO i PGDO u Fenton sistemu pomoću EPR-a, zaključeno je da je formiranje DEPMPO/•OH adukta u Fentonovoj reakciji potpuno inhibirano zbog nastanka adukta sa radikalnim anjonom ugljen-dioksida ($\text{CO}_2^{\bullet-}$, takođe nazvan radikalni anjon). APDO, CPDO i PGDO proizvode $\text{CO}_2^{\bullet-}$ kada su izloženi dejstvu •OH radikala. Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti pektina i APDO utvrđeno je da oni nemaju inhibitorni efekat na *E.coli* i *S. aureus*, ali dovode do inhibicije rasta *S. cerevisiae* i *C. albicans*. Ispitivanjem efekata APDO, CPDO, PGDO (u prisustvu Fenton potencirajućih supstanci) na broj bakterija u kulturama *E. coli* i *S. aureus* zaključeno je za *E. coli* : izloženost kolonije *E.coli* pro-oksidativnim uslovima (Asc + FeCl₃) dovelo je do smanjenja broja živih bakterija za oko 15% (p<0.05); dodatak APDO (p<0.001) i CPDO (p<0.001) je izazvao dodatno smanjenje broja *E. coli*. APDO je pokazao najizraženiji efekat; broj kolonija *E.coli* se smanjio za 65% dodatkom ADPO, dok je dodatak CPDO izazvao smanjenje 45%, posmatrano u odnosu na kontrolni uzorak. Za *S. aureus* je zaključeno sledeće: izloženost kolonije *S. aureus* pro-oksidativnim uslovima nije značajno promenilo broj živih bakterija (p = 0.09).

Broj kolonija se smanjio za oko 20%; u prisustvu pektinskog oligosaharidnog derivata broj živih bakterija je značajno smanjena ($p < 0.001$).; APDO i PGDO su pokazali slične bakteriostatske efekte (smanjenje broja kolonija je veće od 70%), dok je CPDO bio relativno manje efikasan (smanjenje broja kolonija je oko 50%); efekti PGDO na kolonije *S. aureus* bili manje izraženi, u poređenju sa efektima na kolonije *E. coli*. Ispitivanjem promena aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja (SOD, CAT, GSHPx i Gr) kod *E. coli* i *S. aureus* je uočeno da postoji značajno smanjenje aktivnosti GSHPx u odnosu na ostale enzime. Kod *E. coli* aktivnost SOD je značajno manja nakon tretiranja Fenton reaktantima i APDO u poređenju sa kontrolom. Ispitivanjem efekata APDO na imuni sistem (makrofagi i ćelije cervikalnih limfnih čvorova) zaključeno je sledeće: APDO ne izaziva smrt makrofaga ni pri jednoj od primenjenih koncentracija APDO; nakon 24h APDO nije u statistički značajnoj meri uticao na vijabilitet CLNC, dok je nakon 48 h izazvao značajno smanjenje vijabiliteta ovih ćelija, pri čemu je efekat dozno zavisian; smanjenje vijabiliteta CLNC pod uticajem APDO nakon 48 h je verovatno posledica antiproliferativnog delovanja ovih molekula.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do danas su opisani mnogobrojni pozitivni efekti pektina i njegovih derivata na ljudski organizam, ali ne i mehanizmi putem kojih se ti efekti i ostvaruju. U ovoj disertaciji su poređeni efekti derivata dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog i citrusnog pektina i opisani su mogući mehanizmi preko kojih tako dobijena jedinjenja ostvaruju neke od mnogobrojnih bioloških efekata.

Do sada su opisani različiti postupci kojima se može modifikovati pektin a koji uključuju depolimerizaciju, elongaciju lanca i reakcije supstitucije. U ovoj disertaciji je primenjena alkalna hidroliza i vodonik peroksid za dobijanje derivata jabučnog pektina, pri čemu su dobijeni oligosaharidi rastvorljivi u vodi. Ova metoda je prethodno bila korišćena na polisaharidima iz breskvine gume (Yao XC i sar., 2013).

Proces modifikacije (polazni materijal i produkt) praćen je FTIR-om. Rezultati istraživanja ukazuju da je polazni materijal nisko metilovan pektin (LM) i da je to svojstvo i proizvoda što se poklapa sa literaturnim podacima da se LM pektin obično dobija blago alkalnim tretmanom iz HM pektina (Willats WGT i sar., 2006, Ridley BL i sar., 2001, Coenen GJ 2007). Metoda derivatizacije pektina koja je primenjena pripada metodama hemijske depolimerizacije sa oksidacijom. U spektru pektina javlja se veoma intenzivna traka na 1737 cm^{-1} koja se pripisuje istežanju karbonila iz karboksilnih grupa, kao i traka na 1229 cm^{-1} koja odgovara

vibracijama savijanja van ravni hidroksilnih i karboksilnih grupa. Ove apsorpcione trake su gotovo u potpunosti odsutne u spektru derivata pektina, gde su dominantne trake na 1434 cm^{-1} i 1632 cm^{-1} koje ukazuju na simetrične i asimetrične vibracije istežanja karboksilatnih grupa. Trake koje potiču od deformacionih vibracija vode (1628 cm^{-1}) su jasno uočljive u spektru pektina, dok se u spektru APDO preklapaju sa signalima istežanja karboksilatnih grupa.

Primenom metode elektron paramagnetne rezonancije (EPR) identifikovane su realne radikalske vrste koje nastaju u reakciji gvozdá sa vodonik peroksidom (Fentonova reakcija). To je hidroksidni radikal okarakterisan na osnovu karakterističnih linija u EPR spektru posle interakcije sa spin probom DMPO. Utvrđeno je da prisustvo derivata pektina dobijenih iz jabuke (APDO), iz citrusa (CPDO) ili poligalakturonske kiseline (PGDO), u reakcionoj smesi Fentonove reakcije dovodi do promene u proizvodu Fentonove reakcije. Umesto hidroksidnog radikala, kao produkt se pojavljuje ugljen dioksidni radikal anjon (CO_2^-) koji ima duži poluživot u biološkim sistemima u odnosu na hidroksidni radikal i koji specifično reaguje sa proteinskim molekulima. Iz dobijenih rezultata je jasno da oligosaharidi iz poligalakturonske kiseline i oligosaharidi iz jabučnog i citrusnog pektina reaguju sa hidroksidnim radikalom i produkuju CO_2^- . Takođe se može jasno primetiti da ove supstance ne smanjuju intenzitet EPR signala za rezultujući DMPO adukt već ih povećavaju. Ovo se može objasniti većom stabilnosti CO_2^- radikala u poređenju sa OH radikalom (Michelson AM i sar., 1983), što rezultuje u većem prinosu adukta. Oligosaharidi dobijeni alkalnom hidrolizom jabučnog pektina promovišu produkciju CO_2^- (za otprilike 60%) u poređenju sa onim dobijenim iz PGA ili citrusa. U literaturi je već ranije detektovano da komercijalna PGA i pektin iz citrusa reaguju sa OH i produkuju superoksidni radikal anjon (O_2^-) i CO_2^- (Spasojević I i sar., 2010, Bogdanović Pristov J i sar., 2013). Strukturne promene izazvane hemijskim modifikovanjem pektina izgleda da potenciraju dekompoziciju do CO_2^- radikala i nekih drugih EPR-ne reagujućih fragmenata, i da sprečavaju produkciju O_2^- radikala. Za CO_2^- radikal je poznato da specifično cilja proteine (Michelson AM i sar., 1983). Ova osobina CO_2^- radikala može takođe, makar delimično, biti odgovorna za bakteriostatske/baktericidne efekte koje su u daljim eksperimentima pokazali oligosaharidi produkovani iz jabučnog pektina. Ova osobina CO_2^- može takođe makar delimično objasniti do sada uočen širok spektar bioloških efekata derivata pektina od anti-tumorskih do bakteriostatskih/baktericidnih. U literaturi je već sugerisano da su POS bolji kandidati za prebiotike od pektina (Olano-Martin E i sar., 2002) ali su rezultati ove disertacije prvi koji ukazuju na mogući mehanizam preko koga se ostvaruju takvi efekti pektinskih oligosaharida.

Testirani su efekti derivata pektina in vitro na tipičnim predstavnicima gram pozitivnih i gram negativnih bakterija u prisustvu gvožđa i vitamina C. Direktni antibakterijski efekat pokazali su Yao i saradnici, pri čemu su oligosaharidi produkovani iz breskvine gume imali visoku antibakterijsku aktivnost prema *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, i *Escherichia coli* u koncentraciji od 100 µg/mL. Kod *E.coli*, uobičajeni mehanizam indukcije ćelijske smrti baktericidnim antibioticima uključuje generisanje hidroksidnog radikala Fentonovom reakcijom (Vilchèze C i sar., 2013). Rezultati disertacije ukazuju da oligosaharidi produkovani alkalnom hidrolizom jabučnog pektina imaju antibakterijska svojstva u sistemu askorbat (Asc)- gvožđe. Rezultati takođe ukazuju da produkcija $\cdot\text{CO}_2$ radikala, koja je ubrzana za oko 65% sa derivatima pektina od jabuke, u poređenju sa derivatima citrisnog pektina ili derivatima dobijenim od poligalakturonske kiseline, može biti odgovorna za antimikrobnu aktivnost derivata jabučnog pektina na *E.coli* i *S.aureus*. Korišćena je koncentracija askorbata 100 µM, koja predstavlja maksimalnu koncentraciju Asc u plazmi posle oralne suplementacije.

Rezultati ispitivanja aktivnosti antioksidacionih enzima u *E.coli*, posle primene oligosaharida dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina, ukazuju na smanjenje aktivnosti SOD i GSHPx u poređenju sa kontrolom. Poznato je da SOD podleže inaktivaciji različitim supstancama. Hodgson i Fridovich su prvi predložili mehanizam za inaktivaciju peroksidom i gubitak histidina u enzimu goveđih eritrocita u opsegu pH od 10,1 do 10,2 (Hodgson EK i sar., 1975). Salo i saradnici su u svom radu obezbedili dokaze za peptidnu fragmentaciju, a Ookawara i saradnici su pokazali da je ova fragmentacija uglavnom nasumična. Kang i Kim su pokazali da na početku reakcije sa visokim koncentracijama peroksida peptidna fragmentacija se dešava tek nakon oslobađanja hidroksidnog radikala i posledica je peroksidazne aktivnosti enzima. Ovi rezultati ukazuju da se mesto specifična fragmentacija dešava sa manjom verovatnoćom u odnosu na oksidaciju histidina (Ookawara T i sar., 1992, Kang JH i sar., 1997). Rezultati ove disertacije ukazuju da gotovo da nema gubitka ukupnih proteina, što ukazuje da se ne dešava peptidna fragmentacija pod ovim uslovima tako da izgleda neki drugi oksidativni događaji dovode do gubitka aktivnosti enzima. Najverovatniji oksidacioni događaj je reakcija ugljendioksidnog radikala sa enzimom, verovatno u blizini aktivnog centra sa histidinom što dovodi do gubitka aktivnosti SOD. Sličan mehanizam se može pretpostaviti i za smanjenje aktivnosti GSH-Px. U lizatima *S. aureus* nije bilo moguće odrediti aktivnost SOD i CAT. Poredeći aktivnosti kontrola i tretiranih sa APDO uočeno je

smanjenje aktivnost GSH-Px. Pretpostavljeno je da je uzrok isti kao kod *E.coli*, tj. specifična reakcija ugljendioksidnog radikala sa aminokiselinama u blizini aktivnog centra GSH-Px.

Postoje opsežni klinički i eksperimentalni podaci koji ukazuju na anti-tumorska, anti-infektivna i anti alergijska svojstva pektina. Izgleda da pektini pokazuju strukturnu polipotentnost s obzirom na njihov efekat na imuni sistem. Ono što ostaje je da se utvrdi da li su imunomodulatorna svojstva pektina posledica direktnih interakcija sa domaćinom (imunim ćelijama) ili indirektni efekti koji su rezultat interakcija crevnih mikrobiota i domaćina. Rezultati disertacije su pokazali da APDO ne izaziva smrt makrofaga ni pri jednoj od primenjenih koncentracija APDO. Nakon 24 h nije u statistički značajnoj meri uticao na vijabilitet CLNC, dok je nakon 48 h izazvao značajno smanjenje vijabiliteta ovih ćelija, pri čemu je efekat dozno zavisian. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da je zapaženo smanjenje vijabiliteta CLNC pod uticajem APDO nakon 48 h verovatno posledica antiproliferativnog delovanja ovih molekula.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Martinov J, Krstić M, Spasić S, Miletić S, Stefanović-Kojić J, Nikolić-Kokić A, Blagojević D, Spasojević I, Spasić BM. **Apple pectin-derived oligosaccharides produce carbon dioxide radical anion in Fenton reaction and prevent growth of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.** Food Res Int 2017; 100: 132-136.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Mehanizmi bioloških efekata jedinjenja dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina“ dr Jelene Martinov, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mogućih mehanizama kojim derivati pektina ostvaruju neke od mnogobrojnih bioloških efekata. Takođe, doktorat predstavlja i doprinos kandidata u istraživanju prebiotika u gastroenterologiji time što je derivatizovan pektin iz jabuke u alkalnim uslovima uz primenu vodonik peroksida. Dobijeni derivati su okarakterisani FTIR spektroskopijom, a EPR analiza je ukazala na moguće nove osobine derivata time što transformišu hidroksidni radikal u ugljen dioksidni radikal anjon. U daljim ispitivanjima pokazano je da derivati jabučnog pektina imaju antibakterijske efekte na *E.coli* i *S. aureus* u prisustvu Fentonovih reaktanata a nemaju efekte na imuni sistem što ukazuje potrebu daljeg razvoja istih radi njihove primene u gastroenterologiji.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jelene Martinov i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 04.04.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Tomica Milosavljević

Prof. dr Tatjana Simić

Prof. dr Dragomir Damjanov

Mentor:

Prof. dr Miodrag Krstić

Komentor:

Prof. Mihajlo Spasić
