

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.5.2019. године, на основу молбе ментора, др Ладе Живковић, ванредног професора Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета и др Марије Савић Веселиновић, доцента Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Дијане Б. Топаловић**, асистента Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, под насловом: **„Процена антигенотоксичног потенцијала етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви *in vitro* код човека“**, у саставу:

1. др Лада Живковић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. др Марија Савић Веселиновић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет
3. др Нинослав Ђелић, редовни професор, Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Дијане Б. Топаловић под насловом: „Процена антигенотоксичног потенцијала етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви *in vitro* код човека“ је написана на 118 нумерисаних страна и садржи 12 слика, 5 табела и 19 графика. Текст ове докторске дисертације се састоји од 7 поглавља: Увод (1-29. страна), Циљеви истраживања (30. страна), Материјал и методе (31-39. страна), Резултати (40-67. страна), Дискусија (68-83. страна), Закључци (84. страна) и Референце (85-118. страна). Поред текста који припада наведеним поглављима, дисертација садржи и стране без нумерације: Насловну страну на српском и енглеском

језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област, Ужа научна област и УДК број), Листу скраћеница, Садржај, Биографију аутора, као и попуњене и потписане изјаве (Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу).

Ова докторске дисертација је урађена на Катедри за патобиологију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, у оквиру пројекта ”Аберације ћелијског циклуса и утицај оксидативног стреса на неуродегенеративне процесе и малигну трансформацију ћелије” (ОИ 173034, носилац пројекта проф. др Биљана Потпаревић).

2. Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** докторске дисертације се састоји од четири потпоглавља. У првом су дати основни подаци о синтези и механизму дејства тиреоидних хормона, катехоламина, естрогена и диетилстилбестрола. У другом потпоглављу је приказан литературни преглед истраживања генотоксичних ефеката описаних хормона применом различитих тестова. У трећем потпоглављу је објашњен појам оксидативног стреса и услови његовог настанка. Наведени су биомаркери који су индикатори таквог стања, са посебним освртом на могућа ДНК оштећења која се могу детектовати различитим методама, па и применом комет теста у оквиру истраживања тог типа. Средишњи сегмент Увода је посвећен антиоксидансима – механизмима њиховог дејства, навођењу група једињења која им припадају, као и њиховим досадашњим испитивањима применом комет теста. У последњем делу увода су наведене компоненте етанолног екстракта листа маслине које су се заједно или одвојено користиле у *in vitro* и *in vivo* испитивањима показујући антиоксидативни потенцијал. На основу претходно публикованих радова, утврђено је да антиоксиданси, међу њима и екстракт листа маслине, могу утицати и на ниво оштећења ДНК молекула изазваних различитим оксидансима.

У оквиру поглавља **Циљеви рада**, јасно су дефинисани главни научни циљеви ове докторске дисертације. Они су подељени у три групе. Основни циљ ове дисертације био је испитивање антигенотоксичног потенцијала различитих концентрација екстракта листа маслине у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви човека *in vitro*. Из овог главног циља су проистекла и преостала два. Први, да се испита и квантификује способност хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола да у различитим концентрацијама изазову оштећења ДНК у леукоцитима периферне крви човека *in vitro*. Други циљ је био да се процени кинетика репарације оштећене ДНК у присуству екстракта листа маслине у односу на оштећења изазвана хормонима тироксин, адреналин, естрадиол и

диетилстилбестрол у леукоцитима периферне крви човека *in vitro*.

У поглављу **Материјал и методе**, наведене су и описане све методе и примењени експериментални протоколи коришћени у реализацији постављених циљева. У одговарајућим потпоглављима су објашњени поступци сакупљања и третирања узорака и дат је детаљан приказ припреме узорака и њихове даље анализе. Објашњен је одабир концентрација хормона који су коришћене у почетном делу експеримента, као и критеријуми за одабир концентрација у даљем експерименталном раду. На сличан начин је аргументован одабир концентрација коришћеног екстракта листа маслине. У сврху тестирања генотоксичног потенцијала хормона, као и генотоксичног и антигенотоксичног потенцијала екстракта листа маслине примењене су методе флуоресцентне микроскопије и визуелне анализе комет тестом који је детаљно представљен. Тиме је извршена квантификација степена оштећења ДНК молекула услед које се могла извршити категоризација оштећења (класе А, Б, Ц, Д, Е). Антиоксидативни потенцијал екстракта листа маслине је испитиван у претретману (пре апликације одабране концентрације сваког хормона) и посттретману (након апликације хормона). На исти начин је тестирано и једињење кверцетин, чији је антиоксидативни потенцијал литературно документован. У потпоглављу Статистичка обрада података је наведен примењени програм (GraphPad Prism 6.0) и тестови (анализа варијансе) који су коришћени за квантитативно објашњење експериментално добијених резултата.

Поглавље **Резултати** се састоји из четири потпоглавља у којима су приказани резултати истраживања добијени у овој тези. У оквиру првог потпоглавља, приказани су резултати испитивања генотоксичности четири одабрана хормона, односно њихове способности да доведу до оштећења ДНК молекула. За сваки од одабраних хормона је приказан проценат анализираних ћелија са ДНК оштећењима која су изазвали у примењеним концентрацијама, након чега су детаљније приказани и степени оштећења ДНК само одабране концентрације сваког хормона (која је коришћена у даљим експериментима). У третману адреналином је заступљеност ћелија са ниским и средњим оштећењима ДНК била већа, за разлику од осталих тестираних хормона код којих су биле заступљеније ћелије са високим и потпуним оштећењем. У другом потпоглављу, описани су ефекти сувог екстракта листа маслине на оштећења ДНК изазвана хормонима. Ефекти су приказани кроз резултате два коришћена експериментална протокола: претретмана и посттретмана. У оба случаја је екстракт листа маслине значајно редуковао проценат оштећења изазваних хормонима, али није било разлика између третмана. Генерално је проценат оштећења генетичког материјала био нижи у претретману екстрактом маслине, за све примењене хормоне, изузев за адреналин. У трећем потпоглављу Резултата приказани су ефекти познатог антиоксиданса кверцетина на оштећења ДНК узрокованих одабраним концентрацијама хормона. За разлику од екстракта маслине, кверцетин је значајно редуковао оштећења за све хормоне у претретману, док је у постретману то значајно

једино за адреналин. Значајне разлике између третмана су уочене једино за диетилстилбестрол. У четвртом потпоглављу, приказан је ефекат екстракта листа маслине на кинетику репарације оштећене ДНК након третмана хормонима. Резултати су приказани кроз динамику репарације оштећења ДНК изазваних хормонима у дефинисаним временским интервалима након третмана сваким од хормона, у присуству и без присуства екстракта листа маслине.

Поглавље **Дискусија** обухвата разматрање добијених резултата и њихово поређење са доступним публикованим подацима, који су у вези са испитиваном проблематиком. У овом поглављу су истакнута сва значајна и нова сазнања у овој докторској дисертацији, са критичким освртом на резултате других истраживања у овој области. Изнета су оригинална разматрања поткрепљена постојећим подацима и најновијим експерименталним доказима. Дискусија је подељена на три целине. У првом делу, дискутована је генотоксичност хормона и степен оштећења ДНК молекула узрокованих дејством одабраних хормона. Кандидаткиња констатује да су концентрације хормона које су испољиле генотоксични ефекат у складу са литературним подацима, али наглашава којим типовима тестова за детекцију тог ефекта су они испитивани. Посебно је истакнут значај ове дисертације, и примена комет теста, у разумевању ефекта адреналина на оштећење генетичког материјала, јер су различита истраживања дала опречне резултате. Други део дискусије је посвећен утицају екстракта листа маслине на генотоксични ефекат хормона и кинетику испољавања оштећења ДНК изазваних тестираним хормонима. У одговарајућим сегментима је одвојено дискутован његов утицај на оштећења ДНК изазвана сваким од четири коришћена хормона. Кандидаткиња је дала осврт на хемијски састав коришћеног екстракта листа маслине, као и на метаболизам хормона у вишим концентрацијама (у односу на нормално физиолошко стање) и у контексту досадашњих истраживања тумачила добијене резултате изнете у овој дисертацији. У трећој целини, обједињена су закључна разматрања могућих механизма антигенотоксичног ефекта екстракта листа маслине на оштећења ДНК молекула изазваних хормонима тироксин, адреналин, естрадиол и диетилстилбестрол. Нижи степен оштећења ДНК изазваних адреналином у поређењу са осталим примењеним хормонима, кандидаткиња доводи у везу са другачијим типом рецептора. Такође претпоставља и могуће механизме дејства екстракта листа маслине којим се генерално могу редуковати оштећења генетичког материјала у условима оксидативног стреса.

У **Закључцима** је у сажетој форми дато сумирање најважнијих закључака који у потпуности произилазе из информација изнетим у поглављима Резултати и Дискусија, чиме је истакнут научни значај докторске дисертације кандидаткиње. У складу са организацијом информација представљених у поглављу Резултати, изнети су закључци о генотоксичном потенцијалу анализираних хормона, начину којим доводе до оштећења генетичког материјала и антигенотоксичном потенцијалу сувог екстракта листа маслине.

Адреналин, тироксин, естрадиол и диетилстилбестрол су генотоксични само у високим концентрацијама и до оштећења генетичког материјала доводе услед оксидативног стреса. Екстракт листа маслине може смањити настала оштећења, чиме је потврђен његов антигенотоксични потенцијал, при чему повећање репарације није главни механизам његовог деловања.

У поглављу **Референце**, наводи се листа од 327 цитираних домаћих и страних часописа и књига. Наведена литература се односи на област истраживања од значаја за докторску дисертацију, довољно је широка да покрива све аспекте истраживања, и доприноси објашњењу добијених резултата. Кандидаткиња је навела најважније изворе података релевантне за тему докторске дисертације и укључила велики број нових литературних извора, чије је навођење у самом тексту дисертације примерено и по садржају и по месту.

3. Библиографија

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Радови у часописима међународног значаја

1. **Žukovec Topalović, D., Živković, L., Čabarkapa, A., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B.** (2015): Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 762192, 8 pages. (M21)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4350944/>
2. **Topalović, D., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B., Djelić, N., Bajić, V., Živković, L.** (2018): Assessment of adrenaline-induced DNA damage in whole blood cells with the comet assay. *Arh Hig Rada Toksikol*, 69(4), 304-308. (M22)
<https://content.sciendo.com/view/journals/aiht/69/4/article-p304.xml>
3. **Topalović, D., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B., Pirković, A., Borozan, S., Bajić, V., Stojanović, D., Giampieri, F., Gasparrini, M., Živković, L.** (2018): Dry olive leaf extract attenuates DNA damage induced by estradiol and diethylstilbestrol in human peripheral blood cells in vitro. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, online ahead of pub. (M22)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571818302432?via%3Dihub>

Радови у часописима националног значаја

1. **Topalović, D.**, Živković, L., Đelić, N., Bajić, V., Čabarkapa, A., Jović, S., Spremo-Potparević B. (2015): Genotoksični potencijal nesteroidnih hormona. Veterinarski glasnik, 69(3-4), 255-267. (M51)

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Topalović, D.**, Dekanski, D., Spremo-Potparević, B., Djelić, N., Bajić, V., Živković, L. (2018): Evaluation of adrenaline-induced DNA damage in vitro by comet assay. ICOETox 2018, P135, Porto, Portugal. (M34)
2. **Topalović, D.**, Živković, L., Cabarkapa-Pirković, A., Dekanski, D., Bajić, V., Borozan, S., Spremo-Potparević, B. (2017): Antigenotoxic potential of dry olive leaf extract against DNA damage induced by estradiol and diethylstilbestrol on human peripheral blood leucocytes in Comet assay. ICAW 2017, O38: 58, Pamplona, Spain. (M34)
3. **Žukovec, D.**, Čabarkapa, A., Živković, L., Djelić, N., Dekanski, D., Bajić, V., Spremo-Potparević, B. (2013): Protective Potential of Dry Olive Leaf Extract Against Oxidative Stress in Human Lymphocytes Induced by Thyroxin. Mediterranean Foods on Health and Disease; World Forum for Nutrition Research Conference, Annals of Nutrition & Metabolism, 62(suppl 2):51, Reus, Spain. (M34)

Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Žukovec Topalović, D.**, Čabarkapa, A., Živković, L., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B. (2014): DOLE protects leucocytes from hormone-induced DNA damage in vitro. V Congress of the Serbian Genetic Society, III-12, Beograd. (M64)

4. Мишљење и предлог Комисије

Комисија сматра да истраживање у оквиру докторске дисертације кандидаткиње **Дијане Б. Топаловић** под насловом „**Процена антигенотоксичног потенцијала етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) у присуству хормона тироксина, адреналина, естрадиола и диетилстилбестрола у леукоцитима периферне крви *in vitro* код човека**“ представља оригиналан научни рад, заснован на савременим сазнањима и адекватно и прецизно спроведен. Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме, са јасно дефинисаним циљевима, и садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Добијени резултати су прегледни, јасни и добро критички продискутовани. Остварени резултати су објављени у оквиру четири оригинална научна рада, 3 рада у међународним часописима (један из М21 категорије и два из М22 категорије) и 1 рад у домаћем часопису (категорија М51), а саопштени су на 3 међународна и 1 домаћем научном скупу.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Дијане Б. Топаловић и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

У Београду, 22.5.2019. године

КОМИСИЈА:

др Лада Живковић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

др Марија Савић Веселиновић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Нинослав Ђелић, редовни професор
Универзитет у Београду - Факултет ветеринарске медицине