

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Предрага М. Петровић**, магистра фармације

Одлуком бр. 35/152 од 11.04.2019. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Предрага М. Петровић**, магистра фармације, под насловом

„Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utrififormis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

22.05.2017. – Кандидат Предраг М. Петровић, предложио је тему докторске дисертације под називом: „Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utrififormis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“.

01.06.2017. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/177 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Предрага М. Петровић за израду докторске дисертације под називом: „Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utrififormis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“.

06.07.2017. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/242 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Предрага М. Петровић, под називом: „Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utrififormis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“, док су за менторе поменуте докторске дисертације именовани др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Анита Клаус, ванредни професор Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет.

28.08.2017. – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Предрага М. Петровић, под називом: „Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utriformis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“.

11.04.2019. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/152 о именовану Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Предрага М. Петровић, под називом: „Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utriformis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“

Кандидат Предраг М. Петровић, уписао је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2011/2012. Решењем бр. 20/146 28.09.2018. кандидату је одобрено продужење рока за завршетак докторских студија до краја школске 2019/2020.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду. За менторе ове докторске дисертације именовани су др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Анита Клаус, ванредни професор Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет.

Ментори др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, и др Анита Клаус, ванредни професор Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет, из ове области публиковали су преко двадесет радова у часописима који су на *SCI* листи. Др Бранко Бугарски руководио је израдом девет одбрањених докторских дисертација, а др Анита Клаус једне одбрањене докторске дисертације, што говори о компетентности ментора да руководе израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Предраг М. Петровић, магистар фармације, рођен је 14.01.1987. у Бору, Република Србија. Основне академске студије на Фармацеутском факултету у Београду уписао је 2006., а завршни рад одбранио 2011. године са просечном оценом 9,53. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду уписао је 2011. на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством проф. др Бранка Бугарског. Испите предвиђене планом и програмом, као и завршни испит под називом „Испитивање антибактеријске и антитуморске активности плодноносних тела гљива *Handkea utriformis*, *Calvatia excipulliformis* и *Vascellum pratense*“ на докторским студијама је положио са просечном оценом 9,73.

Од јануара 2012. запослен је као истраживач приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, ИИИ 46010. Звање истраживач сарадник стекао је у јануару 2015., а реизабран фебруара 2018.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Предрага М. Петровић, магистра фармације, садржи 231 страну (од којих је 213 страна нумерисано), у оквиру којих се налази 7 поглавља, 57 слика, 16 табела и 245 литературних навода. Докторска дисертација садржи: Увод, Преглед литературних података, Циљ истраживања, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. По свом облику и садржају, поднети рад задовољава све стандарде за докторску дисертацију Универзитета у Београду.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

Преглед литературних података је подељен на неколико целина, где је најпре истакнут значај гљива за човека, кроз кратак приказ њиховог значаја у исхрани људи и биотехнологији, а акценат је стављен на њихову употребу у медицини. Описане су различите биолошке активности које гљиве поседују, као и лекови пореклом из гљива који се користе у савременој медицини. Посебна пажња посвећена је имуномодулаторној активности гљива чији су носиоци пре свега β -гљукани. У наставку су описане пухаре, група гљива којом се дисертација бави као и детаљан опис врста *Handkea utriformis*, *Handkea excipuliformis* и *Vascellum pratense*. Дат је приказ традиционалне употребе пухара у третману отворених рана, као и модерна нутритивна, медицинска и биотехнолошка истраживања која су рађена на њима.

У оквиру Циља истраживања наведени су сви циљеви докторске дисертације: хемијска и биолошка карактеризација метанолних екстраката младих и зрелих плодноносних тела гљива *Handkea utriformis*, *Handkea excipuliformis* и *Vascellum pratense* и мицелијума *H. utriformis*, као и полисахарадних екстраката мицелијума, младих и зрелих плодноносних тела *H. utriformis*, испитивање на који начин различити стадијума развоја ових гљива утичу на хемијски састав и биолошку активност и инкапсулација полисахаридних екстраката у липозоме и њихова карактеризација.

Експериментални део је обухватио све материјале и методе коришћене у истраживачком раду: производњу мицелијума, методе екстракције (мацерацију метанолом и врелу водену екстракцију) и пречишћавања, методе одређивања садржаја укупних полифенола, шећера и пептида/протеина, појединачних моно- и дисахарида, фенолних киселина, ергостерола, α -токоферола, ловастатина, којичне киселине и слободних масних киселина, анализу гљукана, елементалну анализу, методу инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), гел-екслузиону хроматографију, нуклеарну магнетну резонанцу (NMR), методе испитивања антиоксидативне активности (ABTS, CUPRAC и тест инхибиције оксидативне деградације β -каротена), инхибиторне активности на ензиме (тирозиназа, ацетилхолинестераза, бутирилхолинестераза, HMG-CoA редуктаза, α -амилаза, α -гликозидаза) антимикуробне активности на *Staphylococcus aureus*, метицилин-резистентни клинички сој *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Candida albicans* (микродилуциони тест), цитотоксичну активност на туморске ћелијске линије рака грлића материце (HeLa) и рака дојке (MDA-MB-453), као и здраве моноједарне ћелије периферне крви, имуномодулаторну активност на макрофаге (U937) и моноците (THP-1), методе инкапсулације полисахаридних екстраката у липозоме и њихове карактеризације и испитивање кинетике отпуштања у Францовој дифузионој ћелији и статистичку анализу.

У поглављу Резултати и дискусија, најпре су приказани резултати оптимизације који се односе на хемијску и биолошку карактеризацију метанолних екстраката. Утврђено је да аутолиза, односно сазревање пухара смањује принос метанолне екстракције, док је највећи принос могуће добити из мицелијума *H. utriformis*. Међутим, метанолни екстракти зрелих плодноносних тела показали су се углавном богатијим већином испитиваних биолошки активних компоненти, односно фенолима, ергостеролом, α -токоферолом, *N*-ацетилглукозамином, незасићеним слободним масним киселинама а показали су и бољу антиоксидативну активност која је нарочито била изражена у тесту инхибиције оксидативне деградације β -каротена. екстракти зрелих плодноносних тела такође су показали бољу активност у тесту инхибиције тирозиназе, што их све заједно чини погодним за потенцијлну примену у козметичким производима и производима за третман неких кожних обољења. Метанолни екстракти зрелих плодноносних тела такође су испољили бољу инхибиторну активност на ензиме ацетилхолинестеразу, бутирилхолинестеразу, α -глукозидазу и α -амилазу. Екстракти младих плодноносних тела садржали су више ловастатина и имали израженије инхибиторно дејство према HMG-CoA редуктази. Такође, екстракти младих плодноносних тела и мицелијума *H. utriformis* имали су израженију антимицробну активност. Цитотоксична активност екстраката била је слична према туморским ћелијским линијама, међутим одређени ниво селективности према туморским ћелијама у односу на здраве моноједарне ћелије периферне крви показали су само екстракти *H. utriformis* и *H. excipuliformis*, нарочито екстракти пореклом из зрелих плодноносних тела. Процес сазревања, односно аутолиза води синтези/ослобађању једињења са израженијом антиоксидативном активношћу и инхибиторном активношћу на одређене ензиме укључене у патолошке процесе. Такође, аутолиза води ка лакшој екстракцији одређених једињења са биолошком активношћу, пре свега укупних фенола, ергостерола, α -токоферола и слободних масних киселина, што је нарочито изражено у случају *H. utriformis*. Сазревање неповољно утиче на антимицробну активност екстраката, док нема утицаја на цитотоксичну активност.

У другом делу поглавља Резултати и дискусија представљени су резултати испитивања полисахаридних екстраката мицелијума, младих и зрелих плодноносних тела *H. utriformis*. Утврђено је да се сва три узорка састоје од компоненти већих од 100 kDa, а хемијска анализа узорака обухватала је анализу шећерних и нешећерних компоненти. Гасно-масеном хроматографијом (*GC-MS*) дериватизованих полисахарада, односно парцијално метилованих алдитол ацетата утврђено је да се екстракт мицелијума састоји готово потпуно од глукозе, док су екстракте плодноносних тела чинили врчински глукоза, али и галактоза. Ови шећери потврђени су и *NMR* анализом хидролизата узорака, а утврђено је да су у екстрактима плодноносних тела присутни и у мањој мери маноза, као и редак шећер 3-*O*-метил галактоза. Ови шећери су квантификовани високо ефикасном течном хроматографијом (*HPLC*), при чему је утврђено да се екстракт мицелијума састоји готово искључиво од глукозе (>92%), док су шећери чинили значајно мањи део екстраката плодноносних тела (60.9-70.1, односно 40.2-46.7 %, редом). Даљом анализом састава полисахарида утврђено је да се екстракт мицелијума састоји претежно од α -глюкана, док целокупни садржај глукозе у екстрактима младих, односно зрелих плодноносних тела чини β -глюкане (37, односно 25%, редом). *GC-MS* и *NMR* анализом утврђено је да су α -глюкани екстракта мицелијума налик гликогену, тј. да представљају разгранате (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -*D*-глюкане, док су β -глюкани из екстраката младих и зрелих плодноносних тела највероватније разгранати (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)- β -*D*-глюкани, с тим што је у екстракту младих плодноносних тела заступљено више β (1 \rightarrow 6), а у екстракту зрелих плодноносних тела β (1 \rightarrow 3) веза. Утврђено је да се поред глюкана у екстрактима плодноносних тела налазе и α -*D*-галактани, односно (1 \rightarrow 6)- α -*D*-галактан. Такође је утврђено да галактан, поред галактозних јединица садржи и 3-*O*-метил галактозу, односно да је ланац повремено метилован у положају *C3*. Полисахаридни екстракти садржали су и протеине, који су били релативно отпорни на дејство протеаза, због чега је закључено да чине полисахаридно-протеинске комплексе са глюканима и/или галактанима. Тачан садржај протеина није могао да буде утврђен стандардним методама, али је на основу садржаја азота и сумпора процењен

на око 20, односно 30 % за екстракте младих, односно зрелих плодноносних тела, редом. Полисахаридни екстракти плодноносних тела били су смеђе боје, а екстракт зрелих плодноносних тела био је значајно тамнији и након хидролизе трифлуоросирћетном киселином у њему је могао да буде примећен и водонерастворни преципитат, у коме су, на основу *FTIR* анализе уочене структуре које могу да се повежу са меланинима па је донешен закључак да се током сазревања најпре смањује укупни садржај полисахарида, односно долази до њихове хидролизе, да долази до повећања садржаја $\beta(1\rightarrow3)$ веза у глуканима и да се повећава садржај протеина у макромолекулској фракцији, а да током сазревања додатно долази до њене меланизације. Биолшка активност полисахаридних екстраката, како антиоксидативна, тако и антимикробна била је далеко израженија код екстракта зрелих плодноносних тела, а ова активност приписана је већем садржају фенола и пептидних структура. Имуномодулаторна анализа показала је значајну разлику у активности екстракта мицелијума и плодноносних тела; екстракти плодноносних тела значајно су стимулисали макрофаге и моноците да продукују проинфламаторне цитокине (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*) укључене у имуни одговор организма против ћелија рака. Нешто израженија активност примећена је код екстракта младих плодноносних тела који су садржали више β -глукана. Међутим, екстракти су стимулативно утицали и на лучење имунорегулаторних и антиинфламаторних цитокина (*IL-27* и *IL-10*), што је поново било израженије у случају екстракта младих плодноносних тела. Екстракт мицелијума показао је далеко слабију активност у стимулацији лучења проинфламаторних цитокина (а израженију на *THP-1* него *U937* ћелије), али сличну способност утицаја на лучење *IL-27* и *IL-10* на *THP-1* ћелије.

Полисахаридни екстракти успешно су инкапсулирани у липозоме једноставном пролипозомном методом, са задовољавајућим степеном инкапсулације од око 60, 40 и 50 % у случају екстракта мицелијума, младих и зрелих плодноносних тела, редом. Добијени липозоми били су релативно мали у случају екстракта младих и зрелих плодноносних тела, са највећим процентом честица од 295.3 nm (13.3%), односно 342 nm (11.4%), редом. Липозоми са екстрактом мицелијума били су значајно већи, са највећим бројем честица од 615 nm (18%). И z -потенцијал липозома се разликовао и износио -22, -12 и -8 mV, редом. Стабилност након три месеца показала је да су липозоми са екстрактом зрелих плодноносних тела најстабилнији, и поред најмање апсолутне вредности z -потенцијала, највероватније због специфичности узорка, односно његовог хемијског састава и потенцијалне интеракције са мембраном липозома. Липозоми са екстрактом мицелијума показали су најмању стабилност, која се огледала у јављању пикова у дистрибуцији величина по интензитету који се могу приписати агрегацији и изласку узорака из честица. Студија отпуштања из Францове дифузионе ћелије показала је задовољавајући степен успоравања дифузије инкапсулираних узорака у сва три случаја, која није била комплетна ни након 24h. Отпуштање узорака је у случају екстраката плодноносних тела могло да буде праћено и на основу укупних шећера и на основу апсорпције у *UV* области, а добијени резултати су се релативно добро поклапали, што је такође потврда да су протеини комплексирани са полисахаридима.

У поглављу Закључак таксативно су наведени најважнији закључци изведени из испитивања изложених у претходним поглављима.

Након тога, у поглављу Литература наведене су све референце коришћене током израде и писања докторске дисертације.

На крају докторске дисертације приложена је биографија кандидата.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Докторска дисертација кандидата Предрага М. Петровић, магистра фармације, за предмет има оригиналну и савремену тему која се односи на недовољно испитану групу гљива која има примену у традиционалној медицини. Гљиве синтетишу многобројне и специфичне метаболите који испољавају различита фармаколошка дејства. Неки од метаболита гљива су изоловани, окарактерисани и нашли су примену у званичној медицини, као што су антибиотик пеницилин или антихиперхолестеролемик ловастатин. Многе врсте се, с друге стране користе у традиционалној медицини, нарочито на истоку, спрашене или у виду екстраката, за разне поремећаје, а овим, тзв. лековитим гљивама, све се више пажње поклања и у западној медицини и науци уопште. Због пораста инциденце хроничних болести као што су хипертензија, дијабетес, рак, а лимитираних терапеутских процедура, односно сталне тежње за балансом између бенефита и неминовног штетног деловања лекова, важно је константно трагати за новим лековитим сировинама које могу да се користе у терапији ових и других обољења. Осим тога, у порасту су бактеријска и гљивична обољења изазвана сојевима резистентним на антибиотике, пре свега због њихове нерационалне употребе, али и коришћења имуносупресива или пак услед постојања инфекције као што је ХИВ. Природни производи су препознати као потенцијални извори нових лекова, али и као средства која могу да буду од користи у превенцији многих обољења. Осим у медицини, постоји тренд и у козметологији за употребом природних сировина. Због свега наведеног важно је спроводити скрининг потенцијалних извора нових лековитих сировина, односно скрининг мање истражених природних материјала, као што су биљке и гљиве, а пре свега оних које имају потврђену употребу у народној медицини. Пухаре су у том смислу релативно мало истражене, а докторска дисертација Предрага М. Петровића управо је имала за циљ да испита многа потенцијална деловања екстраката врста *Handkea utrififormis*, *Handkea excipuliformis* и *Vascellum pratense*, од којих друге две скоро да нису ни биле предмет оваквих истраживања. Поред тога што су у екстрактима (бар неких од) ових врста по први пут идентификоване и квантификоване неке фармаколошки активне компоненте (ергостерол, α -токоферол, N-ацетилглукозамин, ловастатин итд), и утврђене разне биолошке активности (антиоксидативна, антимикуробна, цитотоксична, инхибиција неколико ензима укључених у настанак патолошких стања а који су означени као циљна места за терапеутике), извршено је и поређење екстраката младих и зрелих плодноносних тела, као и мицелијума *H. utrififormis* ради утврђивања на који начин, за ову групу гљива специфичан процес аутолизе утиче на хемијски састав и биолошку активност, а због чињенице да се у народној медицини пре свега користи зрела прашкаста глеба ових гљива, што је до сада остало неистражено. Такође, по први пут су детаљно окарактерисани полисахариди из врсте *H. utrififormis*, али и пухара уопште, и поново, пружен је увид у промене којој подлеже ова фракција током сазревања гљиве. Полисахариди гљива су последњих година нарочито предмет опсежних истраживања и њихова разноврсност се тек у скорије време увиђа; β -гљукани су посебно истраживани због њиховог имуномодулаторног деловања и последичног антитуморског ефекта, због чега се њихова комерцијална употреба све више повећава а тржиште шири са истока на запад. Ипак, гљукани различите структуре, из различитих врста показују и различите активности због чега је њихова детаљна карактеризација неопходна. Могућност инкапсулације ових биолошки активних макромолекула је недовољно истражена, а инкапсулација је некада неопходан корак за обезбеђивање модификованог ослобађања и допремања активних супстанци на место деловања. Конкретно, у дисертацији је урађена инкапсулација полисахаридних екстраката у липозоме не би ли се обезбедила примена на кожи која би довела до дубљег продирања водорастворних великих молекула и деловања на имуне ћелије у кожи. Резултати докторске студије дају увид научној јавности о потенцијалу који имају испитиване врсте гљива, али и цела група гљива, односно пухара; док су као младе јестиве и богате нутрацеутицима, као зреле такође имају употребну вредност као извор различитих биолошки активних метаболита и могуће их је користити као материјал за добијање биолошки активних производа за потребе фармацеутске индустрије. На основу свега наведеног, као и опсежног прегледа литературе, може се закључити да се истраживања у оквиру ове

докторске дисертације уклапају у светске трендове и указују на значај и актуелност проучаване проблематике, а да уједно показују велики ниво оригиналности.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације Предрага М. Петровић, магистра фармације, цитирано је 245 литературних навода који су омогућили да се прикаже стање у испитиваној области, као и актуелност теме. На основу пажљиве анализе резултата приказаних у научној литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Савремена и релевантна истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су омогућили боље разумевање добијених резултата, њиховог значаја као и евентуалну примену. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из наведене литературе која је коришћена у истраживању, уочава се велико познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове докторске дисертације су добијени одговарајућим експериментима, применом савремених аналитичких инструменталних метода, према оригиналним или модификованим процедурама из литературе. Метанолни екстракти добијени су мацерацијом, а полисахаридни екстракти врелом воденом екстракцијом, након чега је уследило пречишћавање, тј. дијализа и ензимска депротеинизација у циљу добијања што чистијих полисахарида. Садржај укупних шећера, фенола и протеина одређени су спектрофототријским методама. Садржај појединачних шећера, фенолних киселина, ергостерола, α -токоферола, слободних масних киселина, ловастатина, којичне киселине урађени су *HPLC* (са масеним, *UV* или *RI* детектором) или *GC-MS* методом. Карактеризација полисахаридних екстраката је, поред поменутих метода за квантификацију укупних и појединачних шећерних компоненти, подразумевала и примену *NMR*, *FTIR* и *GC-MS* методе за утврђивање структурних веза полисахарида, као и елементалну анализу и спектрофотометријске методе за одређивање фенолних група и протеина. Биолошке активности узорака испитиване су *in vitro* спектрофотометријским методама, а укључивале су антиоксидативну *ABTS* и *CUPRAC* методу, као и тесту инхибиције оксидативне деградације β -каротена, које су спроведене на метанолним и полисахаридним екстрактима. Инхибиторно деловање метанолних екстраката на ензиме на тирозиназу, ацетилхолинестеразу, бутирилхолинестеразу, *HMG-CoA* редуктазу, α -амилазу и α -глукозидазу урађено је *in vitro* спектрофотометријским методама. Имуномодулаторна метода урађена је имунохемијском *ELISA* методом и примењена је на полисахаридне екстракте. Липозоми су припремљени пролипозомном методом, а њихова физичка карактеризација обухватала је одређивање степена инкапсулације (одређивањем укупних шећера колориметријском методом и директним мерењем апсорпције у *UV* области), мерења расподеле величине по интензитету и *z*-потенцијала на зетасајзеру а студија отпуштања је спроведена у Францовој ћелији. Статистичка обрада података урађена је у програмима Microsoft Excel 2010 и OriginPro 8.

3.4. Примењивост остварених резултата

Хемијска и биолошка карактеризација екстраката испитиваних врста гљива најпре омогућава даља истраживања која би за циљ имала утврђивање свих биолошки активних компоненти и њихову даљу карактеризацију и испитивање потенцијалне медицинске примене. Добијени резултати указују да су испитване пухаре, које су јестиве док су младе

имају велики потенцијал да као зреле, када прођу процес аутолизе и постану нејестиве и даље могу да имају употребну вредност, и да нађу примену у фармацеутским и нарочито козметичким производима јер су богати компонентама укљученим у регенерацију коже, а нарочито врста *H. utriformis*; уз то, оне поседују изузетну антиоксидативну активност, умерену антибактеријску активност и веома изражену инхибиторну активност на ензим тирозиназу због чега би могле да се користе и у третману стања хиперпигментације коже. Такође, показало се да су ове врсте потенцијални извор фармаколошки активних супстанци које имају инхибиторно дејство на ензиме укључене у патолошке процесе, као и дејство на бактерије, гљивице и туморске ћелијске линије и већина компоненти које су одговорне за ова дејства тек треба да буду изолована и окарактерисана. Полисахаридна фракција мицелијума и нарочито плодноносних тела *H. utriformis*, такође могу да нађу медицинску примену код стања ослабљеног имунитета, односно стања где је неопходно додатно активирати имуни систем, као што је рак. Успешност инкапсулације ових фракција потенцијално омогућава и њихову примену на кожи, нпр. у козметичким или другим фармацеутским производима.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спроведећи иновативна и интегративна истраживања током израде докторске дисертације, кандидат Предраг М. Петровић, магистар фармације, показао је сталну тежњу за усавршавањем и овладавањем разичитим аналитичким методама и показао велику ширину у интересовањима што се и одразило на комплексност и мултидисциплинарност његове докторске дисертације. Током својих истраживања, испољио је самосталност у раду, дизајну експеримената и анализи добијених резултата, уз неопходну критичност. На основу бројних постигнутих резултата и изузетног залагања, те доприноса развоју науке, Комисија је мишљења да кандидат Предраг М. Петровић поседује све неопходне квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове докторске дисертације се огледају у:

- хемијској карактеризацији метанолних екстраката младих и зрелих плодноносних тела гљива *Handkea utriformis*, *Handkea excipuliformis* и *Vascellum pratense*, као и мицелијума *H. utriformis*, гљива које имају традиционалну употребу у народној медицини, али које су недовољно истражене у том смислу
- биолошкој карактеризацији метанолних екстраката младих и зрелих плодноносних тела гљива *Handkea utriformis*, *Handkea excipuliformis* и *Vascellum pratense*, као и мицелијума *H. utriformis*, кој је укључивала антиоксидативну активност, антимикуробну активност, цитотоксичну активност на туморске и здраве ћелије као и инхибиторну активност на одређене ензиме укључене у настанак патолошких стања
- испитивању утицаја аутолизе кроз који плодносна тела пухара пролазе на хемијски састав екстраката и њихову биолошку активност
- испитивању мицелијума који је могуће лако узгајати у лабораторијским условима као замене за плодносна тела у смислу сличности хемијског састава и биолошких активности
- хемијској карактеризацији полисахаридних екстраката мицелијума, младих и зрелих екстраката *H. utriformis*, што је укључивало описивање нових глукана и парцијално метилованог галактана, по први пут из ове врсте, али и пухара уопште

- биолошкој карактеризацији полисахаридних екстраката мицелијума, младих и зрелих екстраката *H. utriformis*, што је укључивало антиоксидативну, антимикробну и имуномодулаторну анализу
- испитивању могућности инкапсулације полисахаридних екстраката у липозоме за евентуалну примену на кожи или друге путеве примене

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања везана за хемијску карактеризацију метанолних екстраката испитиваних гљива показала су да су они богати биолошки активним компонентама, али се њихов квалитативни и квантитативни састав разликовао; уз то, принос екстракције био је мањи у случају зрелих плодноносних тела. Екстракт мицелијума *H. utriformis* био је најбогатији шећерима (око 50%), а трехалоза, важан индустријски шећер чинила је око 50% ове фракције. Екстракт мицелијума је такође био релативно богат ергостеролом и слободни масним киселинама, али је друге испитиване активне метаболите садржао у мањој мери него други екстракти. Екстракти младих плодноносних тела нарочито су били богати ловастатитом, у односу на екстракте зрелих плодноносних тела, код којих садржај овог антихиперхолестеролемика опада након аутолизе. Екстракти зрелих плодноносних тела су међутим били углавном богатији фенолима, ергостеролом, масним киселинама, α -токоферолом, а нарочито *H. utriformis*, што указује на то да аутолиза доводи до синтезе/ослобађања и/или лакше екстракције ових компоненти. Такође, само је у екстрактима зрелих плодноносних тела детектован N-ацетилглукозамин, разградни производ гљивљег полисахарида хитина, који је уједно и градивна јединица хијалуронске киселине, што. Све то чини зрела плодносна тела пухара, која нису јестива, али имају дугу традиционалну употребу у третману отворених рана и кожных обољења, добрим кандидатом за фармацеутске производе за негу коже.

Испитивања биолошке активности показала су поново да екстракти зрелих плодноносних тела имају далеко бољу свеукупну антиоксидативну активност, што је нарочито изражено у тесту инхибиције оксидативне деградације β -каротена. Активност се добро корелисала са укупним фенолним компонентама, које нису могле да буду квалитативно окарактерисане, јер екстракти не садрже ниједан од испитиваних стандарда фенолних киселина. Екстракти зрелих плодноносних тела су такође показали бољу инхибиторну активност на ензиме тирозиназу (што поново има велики значај у потенцијалној примени у козметичким производима јер се инхибицијом овог ензима третира хиперпигментација), али и ацетилхолинестеразу и бутирилхолинестеразу чији инхибитори се користе у терапији неуродегенеративних болести, Алцхајмерове болести и деменције. Разлика у активности према ова два ензима међутим није велика између екстраката зрелих плодноносних тела и екстраката младих плодноносних тела и мицелијума, па пухаре у сва три испитивана стадијума развоја могу да буду потенцијалан извор активних компоненти са инхибиторном активношћу на поменуте ензиме. Бољу активност екстракти зрелих плодноносних тела показали су према α -амилази, као и према α -глукозидази (а најбољу *H. utriformis*), ензимима укључених у метаболизам шећера који су означени као циљна места за развој нових лекова у терапији дијабетеса. С друге стране антимикробна активност екстраката мицелијума и младих плодноносних тела је значајно већа него она коју поседују зрела плодносна тела, што значи да током аутолизе долази до губљења активних агенаса. Цитотоксична активност била је слична код свих екстраката према *HeLa* и *MDA-MB-453* туморским ћелијским линијама и здравим моноједарним ћелијама периферне крви, али је у случају екстраката плодноносних тела *H. utriformis*, и нарочито *H. excipuliformis*, ово дејство било селективније према туморским ћелијским линијама. То чини ове врсте потенцијалним извором нових антимикробних и цитотоксичних једињења.

Истраживања везана за могућност добијања биоактивних полисахаридних екстраката из мицелијума, младих и зрелих плодноносних тела на примеру *H. utriformis* показали су да се

могући принос полисахаридних екстраката код плодоносних тела драматично смањује након аутолизе, током које и долази до хидролизе неких макромолекула, као и да се састав макромолекуске фракције са сазревањем донекле мења. Такође, NMR, GC-MS, HPLC и FTIR показале су да се екстракти плодоносних тела састоје од β -глюкана (окарактерисаних као (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)- β -D-глюкани) и парцијално метилованог α -галактана ((1 \rightarrow 6)- α -D-галактана), а екстракт мицелијума од α -глюкана налик гликогену ((1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -D-глюкан). Мицелијум, произведен на дати начин није адекватна замена за плодоносна тела. Екстракти плодоносних тела садржали су и протеине, али тачан садржај није могао да буде одређен, већ само процењен на основу комбинације више метода; на основу укупног азота и сумпора у узорцима садржај протеина би могао да буде око 20, односно 30 % за екстракте младих, односно зрелих плодоносних тела, редом, што указује на присуство полисахардино протеинских комплекса, какви су раније описани из гљива. Тамна боја екстракта зрелих плодоносних тела, уз FTIR спектроскопију сугерише да овај макромолекулски комплекс садржи и меланинске структуре.

Испитивање биолошких активности полисахаридних екстракта показало је да екстракт зрелих плодоносних тела има далеко бољу антиоксидативну и антимицробну активност, а оба полисахаридна екстракта добијена из плодоносних тела показала су јако изражену имуномодулаторну активност, стимулишући лучење пре свега проинфламаторних цитокина код *THP-1* и *U937* ћелија, који су значајни у борби организма против ћелија рака. Екстракт мицелијума је показао значајно слабију имуномодулаторну активност, што мицелијум поново чини неадекватном заменом за плодоносна тела. Инкапсулација у липозоме показала је да је могуће инкапсулирати овакве макромолекулске комплексе једноставном пролипозомом методом са задовољавајућим степеном инкапсулације од око 60, 40 и 50 %, у случају екстракта мицелијума, младих и зрелих плодоносних тела, редом и да је могуће остварити продужено ослобађање, што је показала студија отпуштања из Францове ћелије.

Досадашња истраживања и добијени резултати дали су велики допринос у разумевању хемијског састава и биолошких активности пухара, и отворили могућност даљих испитивања и потенцијалне примене ових гљива у фармацеутској индустрији.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Предраг М. Петровић, магистар фармације, резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдио је објављивањем радова у часописима међународног и националног значаја, као и саопштавањем радова на међународним скуповима. Резултате свог досадашњег научноистраживачког рада у оквиру докторске дисертације објавио је у укупно 5 публикација, од тога два (2) рада у часописима међународног значаја од којих један (1) рад публикован у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и један (1) рад публикован у истакнутом међународном часопису (M22), два (2) саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34) и једно (1) саопштење са домаћих скупова штампаних у изводу (M64).

Списак радова који су резултат истраживања у оквиру докторске дисертације

Категорија M21a

1. Предраг Петровић, Јована Вундук, Анита Клаус, Маја Козарски, Миомир Никшић, Жељко Жижак, Небојша Вуковић, Гаврило Шекуларац, Саша Дрманић, Бранко

Бугарски (2016) Biological potential of puffballs: A comparative analysis, Journal of Functional Foods, 21, 36 - 49, Elsevier (ISSN: 1756-4646)

Категорија М22

1. Предраг Петровић, Јована Вундук, Анита Клаус, Милица Царевић, Милош Петковић, Небојша Вуковић, Анка Цветковић, Жељко Жижак, Бранко Бугарски (2016). From mycelium to spores: A whole circle of biological potency of mosaic puffball, South African Journal of Botany, 123, 152-160, Elsevier (ISSN: 0254-6299)

Категорија М34

1. Предраг Петровић, Анита Клаус, Јована Вундук, Маја Козарски, Миомир Никшић, Борис Иванчевић, Јелена Поповић Ђорђевић, Бранко Бугарски (2015) Radical Scavenging Activity of Puffballs: Phenols vs Glucans. Third Congress of Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology, Redox medicine, 26, 25.9.-26.9.2015. Београд, Србија (ISBN: 978-86-912893-3-1)
2. Предраг Петровић, Милица Царевић, Јована Вундук, Анита Клаус, Мина Волић, Верица Ђорђевић, Бранко Бугарски (2018) From Mycelium to Spores: Neuroprotective Potential of Mosaic Puffball (*Handkea utriformis*), 9th Central European Congress on Food, CEFood, 116, 24.5.-26.5. 2018., Сибиу, Румунија (ISBN: 978-606-12-1546-1)

Категорија М64

1. Предраг Петровић, Јована Вундук, Анита Клаус, Миомир Никшић, Борис Иванчевић, Бранко Бугарски (2014) Comparative evaluation and characterization of antioxidant potential of three puffball species, International Symposium Natural Products and Drug Discovery - Future Perspectives, 44, 13.11.-14.11. 2014., Беч, Аустрија

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата **Предрага М. Петровић**, магистра фармације, под насловом „**Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utriformis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel**“ представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног и домаћег значаја. Предмет и циљеви који су постављени јасно су наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да докторска дисертација под називом „**Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utriformis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel**“ у потпуности испуњава све захтеване критеријуме, као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати овај Реферат, пружи на увид јавности поднету докторску дисертацију кандидата **Предрага М. Петровић**, магистра фармације, у законом

предвиђеном року, као и да Реферат упути Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 20.5.2019.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Бранко Бугарски, редовни професор,
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

др Анита Клаус, ванредни професор,
Универзитет у Београду,
Пољопривредни факултет

др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор,
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

др Миомир Никшић, редовни професор,
Универзитет у Београду,
Пољопривредни факултет

др Жељко Жижак, научни сарадник
Универзитет у Београду,
Институт за онкологију и радиологију Србије