

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На I редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 16.10.2020. године, на основу молбе ментора, **др Татјане Станојковић**, научног саветника Института за онкологију и радиологију Србије и **др Маје Чакић-Милошевић**, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Нађе Ђ. Грозданић Станисављевић**, истраживача сарадника Института за онкологију и радиологију Србије, под насловом: „**Биолошки одговор одабраних типова ћелија на деловање екстракта алги *Fucus spiralis* Linnaeus и *Fucus virsoides* J.Agardh in vitro**“, у саставу: **др Татјана Станојковић**, научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије, **др Маја Чакић-Милошевић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Марија Марин**, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду, **др Гордана Здунић**, научни саветник Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ и **др Весна Мачић**, виши научни сарадник Института за биологију мора Универзитета Црне Горе.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Нађе Ђ. Грозданић Станисављевић** под насловом „**Биолошки одговор одабраних типова ћелија на деловање екстракта алги *Fucus spiralis* Linnaeus и *Fucus virsoides* J.Agardh in vitro**“ урађена је у Институту за онкологију и радиологију Србије, у Лабораторији за модификаторе биолошког одговора, Одељења за експерименталну онкологију уз сарадњу мултидисциплинарног и интернационалног тима са Универзитета „El Jadida“, Мароко; Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Београд; Института за биологију мора, Котор, Црна Гора; Универзитета у Крагујевцу, Природно-математичког факултета; Универзитета у Београду, Фармацеутског факултета.

Докторска дисертација је написана на 79 страна и састоји се из следећих поглавља: Увод (19 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (5 страна), Резултати (31 страна), Дискусија (8 страна), Закључци (1 страна) и Литература (10 страна). Дисертација садржи 21 слику и то: 7 у поглављу Увод и 14 у поглављу Резултати и 12 табела и то: 1 у поглављу Увод и 11 у поглављу Резултати. Поред тога, дисертација садржи и 8 уводних страна и то: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну

са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Резиме на српском и енглеском језику и Садржај. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Анализа докторске дисертације

У **Уводу** докторске дисертације, кандидаткиња најпре описује распрострањеност и класификацију морских макроалги, а затим и систематско место, морфологију и хемијски састав мрких алги, посебно врста *Fucus spiralis* и *Fucus virsoides*, после чега следи детаљан преглед примарних и секундарних метаболита мрких алги, уз навођење њихових биолошких ефеката. У следећем потпоглављу, кандидаткиња даје преглед главних обележја канцерских ћелија, осврћући се на најчешће коришћене терапијске приступе и њихове недостатке. Посебна пажња посвећена је значају дисрегулације ћелијског циклуса у канцерогенези, типовима и механизмима ћелијске смрти, начинима на које је канцерске ћелије заобилазе, као и способностима канцерских ћелија да индукују процес ангиогенезе, врше инвазију и формирају метастазе. После овога следи преглед актуелних литературних података који се односе на антиканцерски и антиоксидативни потенцијал мрких алги и њихову могућу терапијску примену. У следећем потпоглављу, описују се типови и карактеристике дијабетеса и излажу епидемиолошки подаци о истовременом обољевању од дијабетеса и канцера. У контексту тренутно расположивих приступа у лечењу дијабетеса, разматра се антидијабетички потенцијал мрких алги, посебно преко инхибиције ензима α -глюкозидазе. С обзиром на то да инфекције представљају додатно оптерећење за онколошке пацијенте, уводно поглавље се закључује приказом најчешћих типова инфекција и њихових изазивача и прегледом тренутно постојећих литературних података о антимикуробном потенцијалу екстраката алги.

У поглављу **Циљеви**, кандидаткиња је јасно дефинисала циљеве овог истраживања. Основни циљ је био испитивање биолошког одговора одабраних типова ћелија на дејство екстраката и фракција две врсте алги *F. spiralis* и *F. virsoides*. У складу са примарним циљем поставила је и специфичне потциљеве: одређивање састава масних киселина, укупних фенола и антиоксидативне активности екстраката и фракција; *in vitro* испитивања која укључују одређивање интензитета, механизма и селективности цитотоксичне активности екстраката и фракција према хуманим малигним ћелијским линијама, као и њиховог ефекта на миграцију ћелија и ангиогенезу; испитивање *in vitro* антиглюкозидазне и антимикуробне активности екстраката и фракција; и финално, утврђивање везе између сезонских варијација у хемијском саставу и интензитета биолошке активности екстраката и фракција ендемске врсте алге *F. virsoides*.

У поглављу **Материјал и методе** приказане су и детаљно описане коришћене методе. Објашњени су поступци прикупљања материјала, припремања основних дихлорметан-метанолних екстраката и добијања фракција. Од основног екстракта су

течно-течном екстракцијом добијене петролетарска, етилацетатна и n-бутанолна фракција. Састав масних киселина из сувих петролетарских фракција одређиван је методом гасне хроматографије. Одређивање укупних фенола у испитиваним екстрактима и фракцијама вршено је модификованом Folin-Ciocalteu методом. Антиоксидативна активност екстраката и фракција испитивана је DPPH тестом. Ефекти добијених екстраката и фракција испитивани су на одабраним ћелијским линијама: HeLa (аденокарцином грлића материце), MDA-MB-453 (аденокарцином дојке), LS174T (колоректални аденокарцином), A549 (аденокарцином плућа), K562 (хронична мијелеоидна леукемија), MRC-5 (фетални фибробласти плућа), EA.hy926 (хумане трансформисане ендотелске ћелије умбиликалне вене). МТТ тестом испитана је *in vitro* цитотоксичност екстраката и фракција према наведеним ћелијским линијама. Фазе ћелијског циклуса HeLa ћелија анализирани су проточном цитометријом, при чему је интензитет флуоресценције био директно пропорционалан количини ДНК у свакој ћелији. Тип ћелијске смрти HeLa ћелија након примене екстраката и фракција анализирани су на флуоресцентном микроскопу, после бојења акридин-оранжом и етидијум-бромидом. *In vitro* испитивање утицаја екстраката и фракција на инхибицију ћелијске миграције вршено је коришћењем „scratch“ есеја и EA.hy926 ћелијске линије. На истој ћелијској линији испитиван је и утицај екстраката и фракција на инхибицију ангиогенезе *in vitro*. Антидијабетичка активност је испитивана деловањем екстраката и фракција на инхибицију ензима α -глукозидазе. Врсте микроорганизама на којима је испитиван антимикуробни ефекат екстраката и фракција микродилуционом методом су: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* и *Penicillium italicum*.

У поглављу **Резултати** јасно и концизно су приказани резултати подељени у 11 целина. Резултати су представљени табеларно и графички. Описан је хемијски састав, добијени ефекти екстраката и фракција према испитиваним ћелијским линијама, као и антиоксидативни, антидијабетички и антимикуробни ефекти екстраката и фракција. Показано је да је петролетарска фракција врсте *F. spiralis* имала највећи цитотоксични ефекат према HeLa ћелијској линији. Јесењи екстракт и фракције врсте *F. virsoides* су испољили јачи цитотоксични ефекат према малигно трансформисаним ћелијским линијама у поређењу са летњим узорцима. Показана је и селективност екстраката и фракција у односу на нормалну ћелијску линију. Кандидаткиња је представила резултате који су показали разлику у садржају масних киселина и укупних фенола и биолошкој активности екстраката и фракција добијених из врсте *F. virsoides* узоркованих током различитих сезона. Проапототска активност према HeLa ћелијама је била изражена након третмана етилацетатним фракцијама летњег узорка врсте *F. virsoides*, а затим и врсте *F. spiralis*. Најснажнији утицај на заустављање миграције EA.hy926 ћелија је исказала етилацетатна фракција врсте *F. spiralis*. Спречавање формирања мреже EA.hy926 ћелија је било под утицајем основних екстраката, петролетарске и етилацетане фракције врста *F. spiralis* и јесењег узорка врсте *F. virsoides*, док је само етилацетатна фракција летњег

узорка врсте *F. virsoides* показала *in vitro* антиангиогено дејство. Сви испитивани екстракти и фракције су инхибирали активност ензима α -глукозидазе. Екстракти и фракције обе врсте алги су испољили антимикуробну и антиоксидативну активност.

У поглављу **Дискусија**, подељеном на четири потпоглавља, добијени експериментални резултати се тумаче, критички анализирају и упоређују са подацима из литературе. Први део дискусије односи се на хемијску карактеризацију дихлорметан-метанолних екстраката две врсте алги *F. spiralis* и *F. virsoides* као и добијених фракција. Коментаришу се резултати добијени испитивањем садржаја масних киселина и укупних фенола уз истицање чињенице да је по први пут показано да типови и количина масних киселина зависе од сезоне узорковања алге *F. virsoides*. Како је интензитет антиоксидативне активности био у корелацији са укупним садржајем фенола код узорака врсте *F. virsoides*, али не и код узорака врсте *F. spiralis*, у дискусији се аргументовано разматра могуће објашњење ове појаве. Наиме, кандидаткиња наводи да, поред укупне количине фенола, на биолошку активност утичу и врста и концентрација различитих полифенола у узорцима као и њихове синергистичке и антагонистичке интеракције са другим присутним једињењима. Управо изражена антиоксидативна својства полифенола представљају један од важних фактора у основи њихове значајне антиканцерске активности. Дискусија се наставља у смеру анализе антиканцерског ефекта екстраката, као и фракција испитиваних мрких алги. У ту сврху, детаљно су образложена цитотоксична, антимиграторна и антиангиогена својства екстраката и фракција. По цитотоксичној активности и селективности издвојили су се петролетарска, етилацетатна фракција и екстракт врсте *F. spiralis* и то према HeLa ћелијама. Петролетарска, етилацетатна фракција и екстракт врсте *F. virsoides* показали су нижу, али и даље задовољавајућу цитотоксичну активност и селективност при третирању исте малигно трансформисане ћелијске линије. Посебно је истакнуто да су скоро сви тестирани екстракти и фракције показали високу селективност према малигним ћелијским линијама при чему су највећу селективност испољили екстракти и фракције који су имали и најјаче цитотоксично дејство према HeLa ћелијама. У наставку дискусије разматрају се могући механизми који леже у основи цитотоксичне активности анализираних екстраката и фракција. У вези са њиховим проапоптотским ефектом закључено је да су фракције богате полифенолима и масним киселинама имале изражен ефекат на заустављање ћелијског циклуса. Овај закључак додатно је потврђен анализом морфологије третираних ћелија током које су јасно уочене промене карактеристичне за апоптозу. Кандидаткиња велику пажњу посвећује и другим важним аспектима антитуморског дејства екстраката и фракција, њиховом антимиграторном и антиангиогеном потенцијалу. Посебно је значајно што су екстракти и фракције са најснажнијим цитотоксичним ефектом испољили и најбољи ефекат у спречавању EA.hy926 ћелија да мигрирају и формирају сложене тубуларне структуре. Слабији, али детектован ефекат имали су и екстракти и поједине фракције јесењег узорка врсте *F. virsoides*, док летњи узорак није имао утицаја. Посматрањем свих резултата анализе цитотоксичности, антимиграторних и антиангиогених својства, по свом

дејству издвајају се петролетарска и етилацетатна фракција као и основни екстракт *F. spiralis*, па кандидаткиња сугерише да се ово може довести у везу са активношћу масних киселина и полифенола који су највише заступљени управо у наведеним фракцијама и екстракту. У тексту се полемише и о могућем синергистичном дејству масних киселина и фенола у основним екстрактима. Истиче се и да јесење фракције и екстракти *F. virsoides* генерално имају виши ниво активности од летњих, што јасно указује да сезонски фактори средине у којој алге расту утичу на њихов биолошки потенцијал. На основу хемијске анализе испитиваних узорка алги *F. spiralis* и *F. virsoides*, која је показала и сезонске разлике, резултати докторске тезе су потврдили досадашње податке из литературе да управо фенолна једињења и масне киселине ових алги могу бити одговорни за биолошке активности екстраката и фракција. У наредној целини дискусије, фокус је био на антидијабетичкој активности екстраката и фракција. Анализирани су резултати теста инхибиције α -глукозидазе, ензима кључног за разлагање сложених угљених хидрата. Кандидаткиња наглашава да су сви тестирани екстракти и фракције испољили знатно јачу инхибицију ензима α -глукозидазе у односу на примењени стандардни антидијабетички лек акарбозу. Потребно је истаћи да је у овом раду први пут показано инхибиторно дејство екстраката и фракција врсте *F. virsoides* на ензимску активност α -глукозидазе, при чему је уочена значајна разлика у дејству између јесењих и летњих узорка, што је кандидаткиња јасно образложила. Наиме, инхибиција ензима α -глукозидазе највероватније потиче од фенола, који су били знатно заступљенији у јесењим узорцима врсте *F. virsoides*. Добијени резултати показали су да алга *F. virsoides* има потенцијал да се користи за регулисање нивоа глукозе у крви. Додатно се истиче и да други конституенти екстраката, заједно са фенолима и незасићеним масним киселинама, доприносе високој инхибицији ензима. Ово се може закључити на основу хемијског састава врсте *F. spiralis* која је, иако је имала мање укупних фенола и незасићених масних киселина, показала бољу инхибицију ензима α -глукозидазе од испитиваних екстраката врсте *F. virsoides*. У завршном делу дискусије разматра се потенцијал екстраката и фракција анализираних мрких алги за контролу резистентних патогена који представљају озбиљан проблем у лечењу имунокомпромитованих болесника оболелих од малигнух болести. Тестирани екстракти и скоро све фракције испољили су знатно антимикуробно дејство. Управо ови резултати их издвајају као потенцијалне кандидате за даља испитивања антимикуробне активности. Њиховим комбиновањем са уобичајеним антимикуробним агенсима могла би се повећати ефикасност стандардне терапије и смањити резистенција микроорганизама. Резултати су показали и различит степен осетљивости бактеријских и гљивичних сојева на дејство екстраката и фракција што кандидаткиња образлаже разликама у грађи ћелијског зида ових патогена. На крају дискусије кандидаткиња, кратким освртом, сугерише потенцијални правац кретања будућих истраживања мрких алги.

У поглављу **Закључци** сумирани су најважнији закључци произашли из *in vitro* експеримената ове докторске дисертације. Кандидаткиња је закључила да су екстракти и фракције испољили селективно цитотоксично дејство према малигну трансформисаним

ћелијским линијама и индуковали апоптозу, при чему је најјачи проапоптотски ефекат испољила етилацетатна фракција врсте *F. spiralis*. Екстракти и фракције су испољили антиангиогени и антимигрантни ефекат, инхибирани су ензим α -глукозидазу и остварили антимикуробно дејство. Ефекти испитиваних екстраката и фракција су зависили од врсте алги и њиховог специфичног састава у квалитативном и квантитативном смислу. Показано је и да су сезонске варијације срединских фактора утицале на продукцију активних компоненти екстраката и фракција. Биолошка активност екстраката и фракција зависила је од садржаја укупних фенола и масних киселина, њиховог могућег синергистичког и/или антагонистичког дејства, као и њиховог односа са другим активним метаболитима у испитиваним екстрактима и фракцијама. Резултати анализе биолошке активности екстраката и фракција врста *F. spiralis* и *F. virsoides*, добијени у овом раду, указују на обећавајући антиканцерски и фармаколошки потенцијал ових макроалги.

Литература садржи 174 библиографске јединице које су адекватно цитиране у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. N. Grozdanić, G. Zdunić, K. Šavikin, I. Đuričić, M. Kosanić, V. Mačić, I. Matic, T. Stanojković, Seasonal variation in biopharmaceutical activity and fatty acid content of endemic *Fucus virsoides* algae from Adriatic Sea, *Acta Pol Pharm*, (2019); 76(5): 833-844, **M23**
ДОИ: <https://doi.org/10.32383/appdr/108920>
Линк: <https://www.ptfarm.pl/wydawnictwa/czasopisma/acta-poloniae-pharmaceutica/110/-/28328>
2. N. Grozdanić, I. Đuričić, M. Kosanić, G. Zdunić, K. Šavikin, S. Etahiri, O. Assobhei, J. Benba, S. Petović, I. Matic and T. Stanojković, *Fucus spiralis* extract and fractions: anticancer and pharmacological potentials, *JBUON*, (2020); 25(2): 219-1229, **M23**
ДОИ: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3828472>
Линк: <https://jbuon.com/archive/25-2-1219.pdf>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. N. Grozdanić, T. Stanojković, Z. Kljajić, V. Mačić, G. Zdunić, K. Šavikin, The cytotoxic activity of Adriatic Sea endemic algae *Fucus virsoides* extract and fractions, *3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research (SDIR) with international participation „Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment“*, Belgrade, Serbia, 6-7 October 2017, **M 34**

2. U. Čakar, N. Grozdanić, K. Šavikin, G. Zdunić, S. Etahiri, J. Benba, O. Assobhei, T. Stanojković, Screening of cytotoxic activities of *Fucus spiralis* seaweed fractions, *Pharmacy and Pharmaceutical Science World Congress, FIP 2018. Glasgow, United Kingdom*, 2-6 September, 2018, **M 34**
3. N. Grozdanić, V. Mačić, G. Zdunić, K. Šavikin, I. Matić, Z. Kljajić, T. Stanojković, *In vitro* evaluation of anti-migration and anti-angiogenic effect of *Fucus virsoides* seaweed and influence of seasonal variations, *HDIR-5 „Translating Science to Medicine – Targets and Therapeutics“*, Zagreb, Croatia, 8-10 November, 2018, **M 34**
4. U. Čakar, N. Grozdanić, G. Zdunić, K. Šavikin, S. Etahiri, J. Benba, O. Assobhei, T. Stanojković, Alpha glucosidase inhibition, phenolic content and antioxidative activity of *Fucus spiralis* fractions, *79th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Abu Dabi, UAE*, 22-26 September, 2019, **M34**.
5. N. Grozdanić, G. Zdunić, K. Šavikin, Etahiri Samira, Benba Jamila, Assobhei Omar, S. Petović, Матић Ивана I. Matić, T. Stanojković., *In vitro* anti-migration and anti-angiogenic effects of *Fucus spiralis* seaweed, *Fourth Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation „Bringing Science to Oncology Practice: Where is Serbia?“*, Belgrade, Serbia, 3-5 October 2019, **M34**.

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација је предата на проверу оригиналности 01.10.2020.

Мишљење и предлог Комисије

Из прегледа изложених резултата докторске дисертације може се закључити да научна активност **Нађе Грозданић Станисављевић** представља оригиналан научни допринос у области биологије канцера. Резултати истраживања ове дисертације су објављени у међународним часописима у оквиру два оригинална научна рада у којима је **Нађа Грозданић Станисављевић** први аутор.

Нађа Грозданић Станисављевић је афирмисани истраживач у области биологије малигне ћелије, способна да самостално дефинише научни проблем, а потом креативно и критички приступи његовом истраживању и решавању. У потпуности влада методологијом и савременим истраживачким техникама те, сходно томе, учествује у свим фазама истраживачког рада који је пред њу и групу којој припада постављен.

Имајући у виду целокупну научну активност, актуелност истраживачке проблематике и значај постигнутих резултата, комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Нађи Грозданић Станисављевић** да приступи јавној одбрани докторске дисертације под насловом „**Биолошки одговор одабраних типова ћелија на деловање екстраката алги *Fucus spiralis* Linnaeus и *Fucus virsoides* J.Agardh in vitro**“.

КОМИСИЈА:

У Београду, 21.10.2020. године

др Татјана Станојковић, научни саветник
Институт за онкологију и радиологију Србије

др Маја Чакић-Милошевић, ванредни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Марија Марин, доцент
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Гордана Здунић, научни саветник
Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“

др Весна Мачић, виши научни сарадник
Универзитет Црне Горе, Институт за биологију мора