

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На I редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 14.10.2022. године, на основу молбе ментора, др Биљане Божић Недељковић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Бојана Божића, вишег научног сарадника Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Тање М. Лунић, истраживача сарадника Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом: „Испитивање имуномодуlatorног потенцијала екстраката маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw.“, у саставу: др Анета Сабовљевић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Марко Сабовљевић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор, Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, др Тања Џопалић, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Нишу и др Сергеј Томић, виши научни сарадник, Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП, Универзитет у Београду.

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 Тање М. Лунић под насловом „Испитивање имуномодуlatorног потенцијала екстраката маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw.“ обухвата: 183 странице текста са 26 слика, 21 графиком и 18 табела. Текст се састоји од седам поглавља и то: Увод (37 страна), Циљеви (3 стране), Материјал и методе (30 страна), Резултати (54 стране), Дискусија (24 стране), Закључци (5 страна) и Литература (15 страна).

Дисертација садржи и 9 уводних страна и то: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, захвалницу,

сажетак на српском и енглеском језику и 3 стране садржаја. На крају дисертације приложена су следећа документа: Списак коришћених скраћеница, слика, табела и графика, Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (15 страна).

Експериментални део докторске дисертације урађен је на Биолошком факултету Универзитета у Београду, у лабораторијама Института за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“ и Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“.

Резултати истраживања које је кандидаткиња Тања М. Лунић приказала у овој дисертацији пружају нова сазнања о имуномодулаторном потенцијалу различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа, лета и јесени и њиховој потенцијалној примени у превенцији и третману различитих патолошких стања код човека.

## **Анализа докторске дисертације**

Поглавље **УВОД** састављено је из пет тематских целина у којима су уведени теоријски појмови коришћени у докторској дисертацији и представљена досадашња литературна сазнања значајна за сагледавање проблематике ове дисертације. Прва тематска целина започиње прегледом основних компоненти и функција урођене и адаптивне имуности и увођењем појма и значаја имуномодулације, са посебним освртом на улогу традиционалних биљних лекова као алтернативе синтетским имуномодулаторима. Друга тематска целина обухвата опште карактеристике бриофита, њихову основну класификацију, распрострањеност и примену, а у посебним поглављима се детаљно описују маховина *H. cupressiforme*, као и употреба бриофита у традиционалној медицини. У оквиру треће тематске целине обрађен је хемијски састав бриофита и урађен је преглед најзаступљенијих секундарних метаболита са посебним освртом на полифенолна (фенолне киселине, флавоноиди и кумарини) и терпенска једињења. Након тога следи четврта тематска целина у којој је обрађена биолошка активност бриофита. Она је састављена из пет целина у којима су на систематичан начин описане антиоксидативна, антидијабетична, антитуморска, анти-инфламаторна, као и активност бриофита у зарастању ране. У оквиру ове целине, за сваку од описаних биолошких активности дат је преглед литературе са примерима који се односе на различите представнике бриофита.

Увод се завршава петом тематском целином у којој је уведен појам молекулског докинга и значаја ове методе у дизајнирању и откривању нових терапеутика као и могућих механизма њиховог деловања.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ** кандидаткиња полази од хипотезе да различити екстракти маховине *H. cupressiforme* садрже биолошки активна једињења која испољавају имуномодулаторни ефекат и стога екстракти ове маховине могу имати потенцијалну примену у терапији различитих болести. Како би се ова хипотеза тестирала, постављен је основни циљ истраживања да се изврши хемијска карактеризација различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* и испита њихов имуномодулаторни утицај применом (1) *in vitro* и (2) *in silico* истраживања. У складу са основним циљем истраживања дефинисано је седам истраживачких задатака који се односе на екстракцију, хемијску карактеризацију, одређивање биохемијске и биолошке активности екстраката, селекцију оптималног растварача за екстракцију и оптималног годишњег доба за прикупљање маховине и на крају на *in silico* испитивања и молекулски докинг.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** обухвата 13 тематских целина у којима су описане све примењене експерименталне процедуре, материјали и инструменти коришћени за реализацију постављених циљева. У овом поглављу налазе се сви детаљи неопходни за репродуковање експерименталних протокола. У првој и другој тематској целини дати су преглед хемикалија и реагенаса који су коришћени у експерименталном раду, а детаљно су наведене и рецептуре за припрему раствора и медијума. У трећој, четвртој и петој тематској целини представљена је маховина која је била предмет ове дисертације, заједно са подацима о ваучерима, протоколима, растварачима (вода, етанол, смеша воде и етанола у запреминском односу 1:1 и етил-ацетат), тачним датумима прикупљања за испитиване сезоне (пролеће, лето и јесен), припреми екстраката и одређивању приноса екстракције. У шестој тематској целини приказане су методе коришћене за спектрофотометријско одређивање хемијског састава екстраката: укупног садржаја фенола, фенолних киселина, флавоноида, флавонола, кумарина и тритерпена, као и методе коришћене за квантитативну анализу фенолних једињења (енгл. Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS). У седмој тематској целини следи опис метода коришћених за испитивање антиоксидативне активности (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил, укупни редукциони потенцијал и  $\beta$ -каротен/линолна киселина тестови), а у осмој за

испитивање антидијабетичне активности (инхибиција активности ензима  $\alpha$ -амилазе и  $\alpha$ -глюкозидазе). Девета тематска целина описује нормалне и туморске ћелијске линије коришћене у експерименталном раду: MRC-5, L929, HCT-116, MDA-MB-231, BV2 и SH-SY5Y, а у наредним деловима ове целине је дат детаљан опис одржавања ћелијских култура и третмана екстрактима за одређивање цитокомпатибилности, потенцијалне антитуморске (модел ћелије HCT-116 и MDA-MB-231), антинеуроинфламаторне (модел липополисахаридом – ЛПС-ом и водоник-пероксидом активираних BV2 ћелија) и неуропротективне (модел трансфера супернатаната ЛПС-ом активираних BV2 ћелија на SH-SY5Y неуроне) активности. У десетој тематској целини описане су методе за одређивање антинеуродегенеративне активности (инхибиција активности ацетилхолинестеразе и тирозиназе), а у једанаестој испитивање утицаја на миграцију ћелија у *in vitro* моделу зарастања ране (енгл. Scratch test). У дванаестој тематској целини обрађен је докинг секундарних метаболита идентификованих у екстрактима на ацетилхолинестеразу и тирозиназу гљиве и човека, где су у посебним поглављима описани начин креирања тродимензионалног модела тирозиназе човека, припрема протеина и лиганата за докинг процедуру, као и сама докинг процедура. У последњој, тринаестој тематској целини овог поглавља објашњени су поступци за обраду добијених података коришћењем тестова за статистичку обраду и анализу података у програму SPSS (engl. Statistical Package for the Social Sciences).

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, које обухвата девет тематских целина, презентовани су и детаљно објашњени резултати, пропраћени адекватним и правилно нумерисаним сликама, табелама и графицима. У оквиру прве тематске целине представљен је принос екстраката и показано је да је он варирао у односу на растварач коришћен за екстракцију као и годишње доба у које је маховина сакупљена. Водени екстракти имали су највећи принос екстракције у односу на остале коришћене раствараче, а када су у питању сезонске варијације, најбољи принос је добијен након екстракције маховине прикупљене у јесен помоћу етил-ацетата. Следи друга тематска целина у којој су приказани резултати спектрофотометријског одређивања одабраних класа секундарних метаболита, као и анализе хемијског састава испитиваних екстраката помоћу LC-MS технике. Спектрофотометријске методе су откриле да екстракти маховине *H. cypressiforme* садрже различите класе фенолних једињења, као и тритерпеноиде, при чему њихов састав зависи

од примењеног растварача за екстракцију и годишњег доба током ког је маховина сакупљена. Екстракти маховине сакупљене у лето добијени употребом етил-ацетата као растварача су показали највећи садржај свих испитиваних класа секундарних метаболита (изузев кумарина). LC-MS анализа је показала да је најприсутнија фенолна киселина у екстрактима била *p*-хидроксибензоева киселина, а кемпферол је био најприсутнији флавоноид. Резултати испитивања антиоксидативне активности екстраката представљени су у трећој тематској целини, при чему је направљена подела у односу на механизме антиоксидативног деловања који се испитују коришћеним тестовима. Највећу антиоксидативну активност екстракти су показали у  $\beta$ -каротен/линолна киселина тесту где су се посебно издвојили етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето (при вишим концентрацијама) и сакупљене у пролеће (при најнижим концентрацијама). У четвртој тематској целини представљени су резултати антидијабетичне активности екстраката, где ниједан од тестираних екстраката није инхибирао активност  $\alpha$ -амилазе, док је активност према  $\alpha$ -глукозидази зависила од примењене концентрације екстраката и разликовала се у односу на растварач коришћен за екстракцију. Значајан антидијабетични потенцијал у тесту инхибиције активности  $\alpha$ -глукозидазе испољили су етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето и јесен. Пета тематска целина обухвата резултате цитокомпатибилности и антитуморске активности екстраката маховине сакупљене у пролеће. Цитокомпатибилност екстраката према нормалним хуманим ћелијама фибробласта плућа (MRC-5) била је задовољавајућа. Екстракти нису показали антитуморску активност према HCT-116 ћелијама хуманог колоректалног карцинома, док је значајна антитуморска активност показана према MDA-MB-231 ћелијама хуманог аденокарцинома дојке. Сви екстракти (изузев етанолног) довели су до значајног смањења метаболичке активности MDA-MB-231 ћелија, за око 50%. Такође, сви екстракти маховине сакупљене у пролеће (изузев етанолног) значајно су повећали продукцију реактивних врста кисеоника (РВК) и азот оксида од стране туморских ћелија, што може да представља један од механизма којим су остварили антитуморски ефекат. У шестој тематској целини кандидаткиња је представила резултате антинеуроинфламаторне активности екстраката који су показали да сви испитивани екстракти значајно повећавају метаболичку активност BV2 ћелија, доводећи их до нивоа контролних, нестимулисаних ћелија и смањују продукцију азот оксида, РВК и проинфламаторних цитокина (IL-6 и

TNF- $\alpha$ ) од стране ћелија. Најбољу активност су испољили етил-ацетатни екстракти маховине сакупљени у лето и јесен. Етил-ацетатни екстракти из лета и јесени су смањили и продукцију РВК од стране водоник-пероксидом третираних BV2 ћелија микроглије, а такође су и повећали метаболичку активност BV2 ћелија након њеног смањења услед активације ћелија водоник-пероксидом. Екстракти маховине сакупљени у лето и јесен значајно су смањили и неуроцитотоксични потенцијал солубилних медијатора ослобађених од стране ЛПС-ом активираних ћелија микроглије према SH-SY5Y неуронима, чиме су испољили неуропротективну активност. У седмој тематској целини представљени су резултати антинеуродегенеративне активности, где су екстракти показали значајан потенцијал. Када је у питању инхибиција ацетилхолинестеразе, етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето и јесен (при нижим концентрацијама) су испољили највећу инхибицију активности ензима, док су при вишим концентрацијама најбољи ефекат испољили етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у пролеће. Са друге стране, етанолни екстракт маховине сакупљене у пролеће при вишим концентрацијама је испољио најбољи инхибиторни ефекат према тирозинази, а при најнижим тестираним концентрацијама најбоље су се показали етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето и јесен. Осма тематска целина обухватила је резултате молекулског докинга којима је показано да се секундарни метаболити идентификовани у екстрактима маховине *H. cupressiforme* везују за активно место ацетилхолинестеразе и тирозиназе, чиме се спречава везивање супстрата и долази до инхибиције ензима. Међу испитиваним лигандима, најјачи афинитет везивања према ацетилхолинестерази је показао ериодиктиол, али и флавоноиди генерално. Највећи афинитет према тирозинази гљиве је показао флавоноидни гликозид кверцетин-3-*O*-рутинозид, док су за везивање за тирозиназу човека највећи афинитет показале фенолне киселине, конкретно кофеинска киселина. У деветој тематској целини овог поглавља показано је да екстракти маховине из летње и јесење сезоне не доводе до повећане миграције L929 ћелија мишјих фибробласта тј. убрзања „зарастања ране“ у коришћеном *in vitro* моделу повреде.

У почетном делу поглавља **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња објашњава значај имунског система и имуномодулације у патологији различитих поремећаја код човека као и разлог одабира маховине *H. cupressiforme* као предмета изучавања докторске дисертације. Остатак дискусије је подељен на делове који одговарају редоследу

приказаних резултата где кандидаткиња објашњава њихов значај и критички их анализира цитирањем одговарајуће литературе. Резултати интерпретирани у овом поглављу су продискутовани и упоређени међусобно, као и са публикованим резултатима других аутора за испитивану маховину или њој сродне врсте. Такође, у целом поглављу су кроз дискусију посебно истакнути екстракти маховине са највишим биолошким потенцијалом (како у односу на коришћени растварач тако и у односу на годишње доба сакупљања маховине) као и подаци нови за науку у односу на досадашња истраживања.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** су на основу презентованих резултата и литературних података изведени јасни и прецизни закључци о хемијском саставу испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme*, о њиховим антиоксидативним, антидијабетичним, антитуморским, антинеуроинфламаторним, антинеуродегенеративним и неуропротективним активностима, као и о њиховом утицају на зарастање ране. Поред тога, у овом поглављу кандидаткиња је јасно истакла растварач најпогоднији за екстракцију маховине *H. cupressiforme* као и најповољније годишње доба за сакупљање ове маховине. Такође, на основу резултата молекулског докинга истакнути су секундарни метаболити из екстраката који су показали највећи афинитет за везивање за испитиване ензиме. Поглавље је заокружено сумирањем свих наведених специфичних закључака и извођењем општег закључка о хемијском саставу и биолошком потенцијалу маховине *H. cupressiforme* сакупљене на Вршачким планинама у Србији.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 219 библиографских јединица. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

## **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Lunić, T. M.**, Mandić, M. R., Oalđe Pavlović, M. M., Sabovljević, A. D., Sabovljević, M. S., Božić Nedeljković, B. Đ., Božić, B. Đ. (2022). The Influence of Seasonality on Secondary Metabolite Profiles and Neuroprotective Activities of Moss *Hypnum cupressiforme* Extracts: *In Vitro* and *In Silico* Study. *Plants*, 11(1), 123. (**M21 категорија**) <https://doi.org/10.3390/plants11010123>

2. **Lunić, T. M.**, Oalđe, M. M., Mandić, M. R., Sabovljević, A. D., Sabovljević, M. S., Gašić, U. M., Duletić-Laušević, S.N., Božić, B.D., Božić Nedeljković, B. D. (2020). Extracts Characterization and *In Vitro* Evaluation of Potential Immunomodulatory Activities of the Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. *Molecules*, 25(15), 3343. (M22 категорија) <https://doi.org/10.3390/molecules25153343>

## Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Lunić, T.**, Oalđe, M., Mandić, M., Sabovljević, A., Sabovljević, M., Gašić, U., Duletić-Laušević, S. N., Božić, B. D., Božić Nedeljković, B. (2021). (Bio)Chemical characterization of moss *Hypnum cupressiforme* extracts as potential immunomodulators. In *6th European Congress of Immunology; 2021 Sep 1-4; Virtual Meeting* (p. 296). *European Journal of Immunology* Wiley-VCH GmbH. (M34 категорија)
2. Mandić, M. R., Oalđe, M. M., **Lunić, T. M.**, Sabovljević, A. D., Sabovljević, M. S., Gašić, U., Duletić-Laušević, S. N., Božić, B. D., Božić Nedeljković, B. D. (2021). Immunomodulatory properties of extracts of moss *Hypnum cupressiforme* from various seasons. In *6th European Congress of Immunology; 2021 Sep 1-4; Virtual Meeting* (p. 296). *European Journal of Immunology* Wiley-VCH GmbH. (M34 категорија)
3. **Lunić, T.**, Oalđe, M., Mandić, M., Sabovljević, A., Sabovljević, M., Gašić, U., Duletić-Laušević, S., Božić, B. Božić Nedeljković, B. (2020). Chemical characterization and immunomodulatory potential of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. extracts. In *6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry: session Round Table on Natural Products; 2020 Nov 1-30; Online*. Basel: MDPI. (M34 категорија)

## Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Lunić, T.**, Oalđe, M., Mandić, M., Sabovljević, A., Sabovljević, M., Božić, B. Božić Nedeljković, B. (2022): Uticaj sezonskih promena na sastav sekundarnih metabolita i neuroprotektivnu aktivnost ekstrakata mahovine *Hypnum cupressiforme*: *in vitro* i *in silico* studija. Naučni skup svetski dan imunologije 2022, April 28, Beograd, Srbija. Izdavač Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), pp 19 (M64 категорија)
2. **Lunić, T.**, Oalđe, M., Mandić, M., Sabovljević, A., Sabovljević, M., Gašić, U., Duletić-Laušević, S., Božić, B. Božić Nedeljković, B. (2021): Karakterizacija i imunomodulatorni potencijal ekstrakata mahovine *Hypnum cupressiforme* Hedw. Naučni skup svetski dan imunologije 2021, April 29, Beograd, Srbija. Izdavač Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), pp 9 (M64 категорија)



## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Тање М. Лунић, Б3018/2019 послата је дана 11.11.2022. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 14.11.2022. године.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 7% при чему се назначени делови текста дисертације односе на лична имена, опште појмове, широко коришћене синтагме и скраћенице, латинске називе биљних врста, називе ћелијских линија, стандардне изразе из области истраживања и фразе уобичајене у датој области. Наведена преклапања нису повезана и не чине смислену целину.

С обзиром на наведено, а у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Тање М. Лунић, под насловом „Испитивање имуномодулаторног потенцијала екстраката маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw.”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње Тање М. Лунић, под насловом „Испитивање имуномодулаторног потенцијала екстраката маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw.” представља оригинални научни рад. Током израде и писања докторске дисертације кандидаткиња је показала висок степен познавања научне проблематике, као и способност за самосталан научно-истраживачки рад, постављање јасних циљева и њихову реализацију, критичко разматрање добијених резултата и доношење адекватних закључака. Резултати ове докторске дисертације доприносе бољем разумевању имуномодулаторног потенцијала маховине *H. cupressiforme* сакупљене на Вршачким планинама у Србији.

Резултати ове докторске дисертације публиковани су у два међународна часописа и презентовани на укупно пет конгреса међународног и домаћег значаја.

На основу свега горе наведеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Тање М. Лунић**, под насловом **„Испитивање имуномодулаторног потенцијала екстракта маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw.”** и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 14.11.2022. године

---

др Анета Сабовљевић, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

др Марко Сабовљевић, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор,  
Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду

---

др Тања Цопалић, ванредни професор,  
Медицински факултет, Универзитет у Нишу

---

др Сергеј Томић, виши научни сарадник,  
Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП, Универзитет у Београду