

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одржаној 08.03.2019. године, на основу молбе ментора др Александре Арсић, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милице И. Којадиновић**, истраживача сарадника, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом **„Биолошко деловање полифенола нара (*Punica granatum*, L.) на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита особа са метаболичким синдромом“**, у саставу:

1. др Александра Ч. Арсић, виши научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду – ментор,
2. др Ива Лакић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду – члан.
3. Др Марија Глибетић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду– ментор.

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

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Милице Којадиновић под насловом **„Биолошко деловање полифенола нара (*Punica granatum*, L.) на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита особа са метаболичким синдромом“**, написана је на 117 страна куцаног текста и подељена је у уобичајена поглавља: Увод (23 стране), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (18 страна), Резултати (42 страна), Дискусија (11 страна), Закључци (2 стране) и Литература (20 страна). Докторска дисертација садржи 13 слика, 31 табелу и 10 графикона. У дисертацији је цитирано 208 библиографских јединица. Докторска дисертација садржи и податке о менторима и члановима комисије, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, биографију аутора и потписане изјаве о ауторству, коришћењу и истовестности штампане и електронске верзије доктората.

#### Полазне основе истраживања обухваћених овом тезом:

Метаболички синдром (МС) представља скуп вишеструких кардиометаболичких поремећаја који су повезани са исхраном укључујући централну гојазност, хипертензију, дислипидемију и инсулинску резистенцију. Подаци из литературе указују на то да особе са

МС имају промењен метаболизам липида масних киселина (МК) као и активност ензима антиоксидативне заштите. Адекватан статус полинезасићених МК веома је значајан због важне регулаторне и структурне улоге које н-3 и н-6 полинезасићене МК имају у организму, док је оксидативни стрес рани догађај у патологији МС, а не само његова последица.

Позитиван ефекат конзумирања сока од нара на редокс статус и метаболизам липида до сада је показан код особа са умереним ризиком за кардиоваскуларне болести и пацијената са дијабетесом тип 2. Будући да МС може водити иницијацији и пропагацији поменутих болести, предмет овог истраживања односио се на проучавање ефекта сока од нара на хипертензију, липидни метаболизам и оксидативни статус код особа са МС.

У овој дисертацији су обједињени *in vitro* модели и хумана стања и испитан ефекат метаболита елагинске киселине у *in vitro* условима на вијабилност ћелија аденокарцинома колоне (Како-2 ћелије) као и њихов ефекат на оксидативни стрес.

Анализа докторске дисертације:

Докторска дисертација кандидаткињакиње Милице И. Којадиновић обухвата уобичајена поглавља.

Прво поглавље **УВОД** подељено је у шест целина и садржи четири илустрације. У овом поглављу кандидаткиња дефинише МС и на прегледан начин излаже актуелна сазнања о истом, са посебним освртом на узроке и факторе ризика који доводе до његовог развоја. У другом делу овог поглавља кандидаткиња детаљно описује структуру и функцију фосфолипида, номенклатуру, конформацију, катаболизам, анаболизам и биолошку улогу МК као и најновија сазнања о метаболизму масти и МК код особа са МС. У наставку уводног поглавља приказани су механизми настанка реактивних врста кисеоника, систем антиоксидативне одбране, као и досадашња сазнања о вези између оксидативног стреса и развоја МС. Хемијска структура и улога активних компонената сока од нара приказана је у поглављу број пет, док је у поглављу број шест дефинисана Како-2 ћелијска линија и њена примена. У уводном делу постављене су полазне основе на које ће се кандидаткиња позивати у дискусији добијених резултата.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** аутор на концизан начин излаже циљеве рада који обухватају испитивање ефекта свакодневног конзумирања 300 мл сока од нара током две и шест недеља на:

- вредности систолног и дијастолног крвног притиска, антропометријске, хематолошке и биохемијске параметре;
- профил МК фосфолипида плазме и еритроцита;
- параметре оксидативног стреса у плазми и еритроцитима испитаника.

Осим тога, један од циљева дисертације био је да се вредности свих испитиваних параметара особа са МС упореде са истим код условно здравих особа, као и да се у *in vitro* условима испита ефекат метаболита елагинске киселине (уролитина А, Б, Ц, Д), на вијабилност и оксидативни стрес Како-2 ћелијске линије.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описани су: примењена експериментална методологија, дизајн хуманих интервентних студија, и методе статистичке обраде резултата, које је кандидаткиња Милица И. Којадиновић користила у својим

истраживањима. Описане су спектрофотометријске методе за одређивање садржаја протеина, масти, угљених хидрата, укупних фенола, антоцијана и антирадикалске активности сока од нара, колориметријска метода за одређивање флавоноида, и детаљан опис припреме узорака и анализе садржаја елагинске киселине у соку, методом течне хроматографије под високим притиском на Agilent 1200 Series HPLC апарату. У другом делу овог поглавља прецизно је описан дизајн хуманих интервентних студија које су спроведене у складу са принципима Хелсиншке декларације, а које су одобрене од стране Етичког комитета Клиничко болничког центра Земун, где су и прикупљени узорци. У наставку овог поглавља прецизно је описана метода процене нутритивног статуса, као и методе одређивања вредности хематолошких и биохемијских параметара учесника студија. Одређивање профила масних киселина у плазми и еритроцитима испитаника урађено је методом гасне хроматографије на гасном хроматографу SHIMADZU. Масне киселине су идентификоване упоређивањем са хроматограмом стандарда МК. Резултати су изражавани у процентима од укупно детектованих МК. Антиоксидативна одбрана организма процењена је мерењем активности ензима антиоксидативне одбране супероксид дисмутазе (СОД), каталазе и глутатион пероксидазе, као и мерењем степена липидне пероксидације, спектрофотометријским методама. Метаболичка активност, одређивање цитотоксичности, продукција унутраћелијских реактивних врста кисеоника и активност ензима антиоксидативне заштите у Како-2 ћелијској линији, одређиване су колориметрским и спектрофотометријским методама, што је описано је у завршном делу овог поглавља. На крају поглавља наведене су методе статистичке анализе при чему је за испитивање дистрибуције података коришћен Сапиро-Вилков и Коломогоров-Смирнов тест, за поређење две групе резултата Студентов ттест, док је за анализу разлике између парова коришћен спарени ттест.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** подељено је на 10 целина и документовано 31 табелом, 13 слика и 10 графикана. У првом делу кандидаткиња приказује нутритивни састав сока од нара, док у другом делу пореди антропометријске и хематолошке параметре, липидни и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита здравих и особа са МС. У складу са критеријумима за дијагностиковање МС, кандидаткиња је показала да постоје значајне разлике у вредностима антропометријских параметара, липидног профила, вредностима крвног притиска али и у МК профилу у плазми и еритроцитима између условно здравих и особа са МС. Осим тога, одређујући активност ензима антиоксидативне заштите, кандидаткиња је показала да је код особа са МС активност СОД значајно виша, а активност каталазе значајно нижа, у односу на здраве особе.

У наредном поглављу наведени су испитивани параметри пре и након двонедељног конзумирања 300 мл сока од нара, особа оба пола, са МС. У овом делу је показано да конзумирање сока од нара значајно смањује концентрацију ЛДЛ-холестерола и аспартат аминотрансферазе (АСТ) у серуму, повећава активност делта 9 десатуразе, смањује ниво докозахексаенске киселине у плазми а повећава је у еритроцитима. Осим тога у еритроцитима је повећан ниво дихомогама-линоленске киселине и активност делта 6 десатуразе и елонгазе, док је смањена активност делта 5 десатуразе и глутатион пероксидазе. У целини број 6 кандидаткиња је приказала резултате свих испитиваних параметара учесника шестонедељне студије. Резултати су показали смањење нивоа арахидонске киселине и активности делта 5 десатуразе, а повећање садржаја укупних засићених МК у плазми. У еритроцитима, где су промене биле израженије, детектовано је

повећање нивоа палмитинске, палмитолеинске и олеинске киселине, укупних засићених и мононезасићених МК а смањење нивоа арахидонске киселине, докозапентаенске и докозахексаенске киселине, укупних полинезасићених МК и делта 5 десатуразе. Слично резултатима двонедељне студије, активност глутатион пероксидазе значајно се смањила на крају студије. У поглављу 8, наведени су резултати испитиваних параметара пре и након шест недеља конзумирања сока од нара код испитаница женског пола. Маснокиселински профил плазме особа женског пола био је истоветан МК профили плазме свих испитаника, док је у еритроцитима само ниво докозахексаенске киселине био нижи а ниво мононезасићених МК виши након интервентног периода. Целина број девет садржи резултате ефекта уролитина на раст ћелија аденокарцинома колона Како-2, где је показано да различите концентрације уролитина нису имале цитотоксични ефекат на Како-2 ћелије, као и да краткорочно и дугорочно третирање ћелија уролитинима смањује унутар ћелијску продукцију реактивних кисеоничних врста и активност СОД (целина10).

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња студиозно и критички разматра добијене резултате и пореди са досадашњим сазнањима о ефекту суплементације сока од нара на метаболизам липида и редокс равнотежу у хуманим студијама. Ради бољег сагледавања, комисија анализира најинтересантније налазе овог поглавља, делећи га у четири функционалне целине.

Будући да су у истраживање укључене особе са МС и у складу са критеријума МС, у првом делу дискусије кандидаткиња наводи да су индекс телесне масе, проценат масти, обим струка и кука као и систолни крвни притисак значајно виши код особа са МС у односу на здраве испитанике. Имајући у виду да гојазност, повишен крвни притисак, висок ниво укупног холестерола, триглицерида и ЛДЛ-холестерола представљају факторе ризика за развој кардиоваскуларних обољења, кандидаткиња истиче да осим редовне медикаментне терапије и одређене дијетотерапије и физичка активност мора бити укључена у процес лечења особа са МС. Анализа МК профила плазме показала је висок ниво засићених МК указујући на то да је узрок вероватно појачана синтеза засићених МК, што је повезано са повећаним ризиком од кардиоваскуларних обољења и дијабетеса типа 2. Осим тога процентуални удео линолне киселине, н-6 и укупних полинезасићених киселина, као и процењена активност  $\Delta 5$  десатуразе су били значајно нижи код особа са МС у односу на контролну групу, док је процењена активност  $\Delta 6$  десатуразе и елонгазе била значајно виша. С обзиром на то да полинезасићене МК у организму утичу на флуидност биолошких мембрана, имају хипотензивни, хиполипемисјки и антитромбогени ефекат, учествују у регулацији имуног одговора и имају утицај на канцерогенезу, кандидаткиња истиче да ови резултати негативно утичу на опште стање особа са МС. Осим тога ниска активност  $\Delta 5$  десатуразе према неким ауторима, може бити биомаркер развоја МС, као и независан фактор ризика за инфаркт миокарда.

Маснокиселински профил еритроцита код особа са МС показао је висок садржај засићених МК а низак садржај укупних полинезасићених МК, н-6 и н-3 полинезасићених МК, указујући на то да је синтеза дуголанчаних полинезасићених МК смањена, и да је код особа са МС потребно повећати унос н-3 МК, чиме би се смањиле последице ниског нивоа н-3 полинезасићених МК у организму и побољшало опште стање особа са МС.

Будући да је активност СОД била значајно виша, а активност каталазе значајно нижа код особа са МС, кандидаткиња истиче да је код особа са МС делимично промењен

антиоксидативни одбрамбени систем и да је МС предклиничко стање у коме је неопходно интервенисати.

У другој целини кандидаткиња представља резултате прве интервентне студије у дужини од две недеље где је показано да конзумирање сока од нара доводи до смањења концентрације ЛДЛ-холестерола и тако може водити смањењу ризика од развоја неког од кардиоваскуларних догађаја. Осим тога у плазми ових пацијената дошло је до повећања активноста делта 9 десатуразе, што указује на то да активне компоненте нара могу да утичу на активност ензима који су укључени у биосинтезу МК. Подаци из литературе у *in vitro* условима показали су да се неки полифеноли везују за ППАР-гама (engl. *Peroxisome proliferator-Activated Receptors*), који онда активира гене који кодирају делта 9 десатуразу, што може бити механизам и у *in vivo* условима, истиче кандидаткиња. Конзумирање сока од нара довело је до повећања нивоа дуголанчаних МК у еритроцитима. Имајући у виду да су еритроцити прва линија одбране организма од штетног дејства слободних радикала, виши ниво дуголанчаних МК може потицати од протективног ефекта сока од нара на мембрану еритроцита, односно смањења оксидације дуголанчаних МК. Смањење активности глутатион пероксидазе у еритроцитима, након двонедељног конзумирања сока од нара највероватније потиче од чињенице да активне компоненте нара могу везати водоник-пероксид, смањити његову концентрацију у плазми и тако индиректно водити смањењу активности глутатион пероксидазе.

Резултате шестонедељне студије кандидаткиња је приказала у наредној целини. Примећено је повећање садржаја укупних засићених МК и смањење арахидонске киселине у плазми, као и смањење активности делта 5 десатуразе, што још једном потврђује чињеницу да полифеноли нара утичу на активност овог ензима. Осим тога, повећана синтеза засићених МК указује да полифеноли нара делују и на активност других ензима који су укључени у биосинтезу МК, о чему говоре и промене у нивоима појединих МК у еритроцитима. Слично краћој студији, и у овој је дошло до смањења активности глутатион пероксидазе.

Антиоксидативна активност нара испитивана је и у *in vitro* условима, третирањем Како-2 ћелијске линије метаболитима елагинске киселине, какви су уролитини А, Б, Ц и Д. Мешавина уролитина А, -Б, -Ц, -Д довела је до смањења производње слободних радикала изазваних додатком водоник пероксида, односно до смањења оксидативног стреса. Осим тога показано је и смањење активности каталазе, која метаболише водоник-пероксид до воде и молекулског кисеоника, вероватно као последица директне интеракције уролитина и водоник-пероксида, чиме је смањена његова концентрација у ћелији. На тај начин, истиче кандидаткиња, уролитини смањују оксидативни стрес у ћелији а самим тим могу имати протективни ефекат на патолошка стања у чијој се основи налази оксидативни стрес.

У поглављу **ЗАКЉУЧАК** на јасан начин изведени су закључци који произлазе из добијених резултата и дају одговор на постављене циљеве докторске дисертације. Сходно постављеним циљевима, резултати добијени у овој тези упућују на следеће закључке:

Особе са МС имају већи:

- обим струка, обим кука, систолни крвни притисак, индекс телесне масе и проценат масти,
- концентрацију триглицерида, укупног холестерола, ЛДЛ-холестерола у серуму
- ниво палмитинске киселине, стеаринске киселине и засићених МК у плазми

- процењену активност  $\Delta 6$  десатуразе и елонгазе у плазми
- ниво палмитинске и стеаринске киселине, засићених МК, палмитолеинске и еикозапентаенске киселине у еритроцитима
- процењену активност  $\Delta 5$  у еритроцитима
- активност СОД у еритроцитима

и нижи ниво:

- ХДЛ-холестерола.
- ниво линолне киселине и н-6 полинезасићених МК у плазми,
- ниво линолне, арахидноске, докозатетраенске, докозапентаенске, докозахексаенске киселине и укупних полинезасићених МК, н-6 и н-3 полинезасићених МК у еритроцитима
- процењене активности  $\Delta 9$  и  $\Delta 5$  десатуразе у плазми,
- процењене активности  $\Delta 9$  у еритроцитима,

у односу на здраве испитанике.

Конзумирање сока од нара у трајању од две недеље довело је до:

- значајног смањења концентрације ЛДЛ-холестерола у серуму
- повећања процењене активности  $\Delta 9$  десатуразе у плазми
- смањења нивоа докозахексаенске киселине у плазми
- повећања нивоа дихомогама-линоленске и докозахексаенске киселине у еритроцитима
- повећања процењене активности  $\Delta 6$  десатуразе и елонгазе у еритроцитима
- смањење процењене активности  $\Delta 5$  десатуразе у еритроцитима
- смањења активности глутатион пероксидазе у еритроцитима

а након шест недеља:

- смањење нивоа арахидонске киселине у плазми
- повећање нивоа укупних засићених масних киселина у плазми
- смањење процењене активности  $\Delta 5$  десатуразе у плазми
- повећања нивоа палмитинске, палмитолеинске, олеинске киселине, укупних засићених МК и мононезасићених МК у еритроцитима
- смањење нивоа арахидонске, докозапентаенске и докозахексаенске киселине и укупних полинезасићених МК у еритроцитима
- смањење процењене активности  $\Delta 5$  десатуразе у еритроцитима
- смањења активности глутатион пероксидазе у еритроцитима.

Третирање Како-2 ћелија метаболитима нара, какви су уролитин А, Б, Ц, Д довела је до:

- смањења производње реактивних врста кисеоника и активности ензима каталазе, изазваних додатком водоник-пероксида, у *in vitro* условима

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** приказано је 208 научних публикација које се односе на области од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

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

Б1. Радови у часописима међународног значаја

#### **M21**

1. **Milica I Kojadinović**, Aleksandra Č Arsić, Tamara B Popović, Jasmina D Debeljak Martačić, Aleksandra I Konić-Ristić, Nevena Dj Kardum and Maria D Glibetić, Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid in women with metabolic syndrome, Journal of Science of Food and Agriculture 2017; 97, pages 1798-1804 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.7977> (oblast: Agriculture, Multidisciplinary **8/57**)

#### **M22**

2. **Milica Kojadinović**, Aleksandra Arsić, Gordana Petrović-Oggiano, Marija Gavrović-Jankulović, Marija Glibetić and Milica Popović, Effects of urolithins on oxidative stress of colorectal adenocarcinoma cells-Caco-2, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2017; 68, pages 952-959, <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1328665> (oblast: Food Science & Technology **44/133**)

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

#### **M34**

1. **Kojadinović Milica**, Arsić Aleksandra, Popović Tamara, Kardum Nevena, Konić-Ristić Aleksandra, Glibetić Marija, "Effect of pomegranate juice consumption on lipid profile and blood pressure in patients with metabolic syndrome", October 29-31, 2014, Belgrade, Serbia, Book of abstracts, p 128.

2. **Kojadinović Milica**, Arsić Aleksandra, Konić-Ristić Aleksandra, Kardum Nevena, Novaković Miroslav, Jadranin Milka, Glibetić Marija, "Pomegranate juice consumption decrease level of arachidonic acid in plasma in women with metabolic syndrome: a pilot study", 3-5 June 2015, St Julian's, Malta, Book of abstracts, pp 145.

3. **Kojadinović Milica**, Arsić Aleksandra, Konić-Ristić Aleksandra, Kardum Nevena, Popović Tamara, Martačić-Debeljak Jasmina, Glibetić Marija, "Changes in the membrane phospholipid composition in erythrocytes at patients with metabolic syndrome after consumption of pomegranate juice", FEBS 3+Meeting Molecules of Life, 16-19 September 2015, Portorož, Slovenia, Book of abstracts, pp 166.

4. **Kojadinović Milica**, Popović Milica, Arsić Aleksandra, Debeljak-Martačić Jasmina, Glibetić Marija, "Effect of elagitannins on oxidative stress of colorectal adenocarcinoma cells-Caco-2",

13th Congress of Nutrition “Food and Nutrition-A roadmap to Better Health”, 26-28th October 2016, Belgrade, Serbia, Book of abstract, pp 245, oral presentation.

5. **Kojadinović Milica**, Popović Tamara, Popović Milica, “Interactions of different urolithins with bovine serum albumin”, Plenary meeting of the Association of Resources for Biophysical Research in Europe-Molecular Biophysics in Europe (Arbre-Mobieu), COST Action CA 15126, 22-24th March 2017, Porto, Portugal, poster presentation.

6. **Kojadinović Milica**, Arsić Aleksandra, Popović Milica, “Interactions of different urolithins with human serum albumin”, plenary meeting of ARBRE-MOBIEU “Talking molecules: the networks that shape the living world”, 19-21 March 2018, Warsaw, Poland, Book of abstract, p 56.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

#### **M64**

1. Arsić Aleksandra, **Kojadinović Milica**, Popović Milica, Petrović Snježana, Ristić-Medić Danijela, Glibetić Marija, “Pomegranate juice decrease activity of glutathione peroxidase in subjects with metabolic syndrome”, Joint meeting of national physiological societies “New perspectives in physiological research-young investigator forum”, 25-27th May 2017, Subotica, Serbia, poster presentation.



## Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да докторска дисертација **Милице И. Којадиновић** представља две интервентне студије у којима је анализиран ефекат конзумирања сока од нара на антропометријске, хематолошке и биохемијске параметре, статус МК у плазми и еритроцитима и параметре оксидативног стреса код особа са МС, као и ефекат метаболита елагинске киселине на параметре оксидативног стреса у *in vitro* условима. Добијени резултати указују да конзумирање сока од нара у трајању од две и шест недеља мења липидни и МК профил али и активност ензима антиоксидативне заштите код особа са МС. Имајући у виду значај и научну вредност резултата, као и то да су резултати поменутих истраживања објављени у два научна рада категорије М21 и М22, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Милице И. Којадиновић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Биолошко деловање полифенола нара (*Punica granatum*, L.) на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита особа са метаболичким синдромом**”.

У Београду, 11.03.2019. године

КОМИСИЈА:

---

др Александра Арсић, виши научни сарадник,  
Институт за медицинска истраживања-Универзитет у Београду

---

др Ива Лакић, доцент,  
Биолошки факултет-Универзитет у Београду

---

др Марија Глибетић, научни саветник,  
Институт за медицинска истраживања-Универзитет у Београду