

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

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.07.2019. године, на основу молбе ментора др Мелите Видаковић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, и др Светлане Динић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милоша М. Ђорђевића**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду под насловом: „**Молекуларни механизми антиоксидативног дејства екстракта кичице (*Centaurium erythraea Rafn*) у експерименталном моделу дијабетеса пацова**“, у саставу: др Мелита Видаковић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду - ментор, др Светлана Динић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду - ментор, проф. др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду - члан.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Милоша М. Ђорђевића**, под насловом „**Молекуларни механизми антиоксидативног дејства екстракта кичице (*Centaurium erythraea Rafn*) у експерименталном моделу дијабетеса пацова**“, урађена је на Одељењу за молекуларну биологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Сигнални молекули у дијабетесу: идентификација потенцијалних биолошких маркера укључених у модификацију и интеграцију сигналних путева у циљу предикције и интервенције у дијабетесу“, потпројекат „Генетска

предиспозиција за развој дијабетеса тип 1 и нови приступи у превенцији дисфункције β -ћелија у дијабетесу: изучавање путева преноса сигнала посредованих CXCL12 (ОИ173020), финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација је написана на укупно 214 страна компјутерски обрађеног текста, од чега је 191 страна нумерисана. Нумерисани текст садржи 7 поглавља: **Увод** (38 страна), **Хипотеза и циљеви истраживања** (3 стране), **Материјал и методе** (35 страна), **Резултати** (50 страна), **Дискусија** (26 страна), **Закључци** (4 стране) и **Литература** (35 страна). Дисертација садржи 29 слика (5 у поглављу Увод, 1 у поглављу Материјал и методе, 23 у поглављу Резултати) и 12 табела (3 у поглављу Материјал и методе, 9 у поглављу Резултати). Поглавље Литература садржи 470 библиографских јединица које су адекватно наведене у тексту. Ненумерисани текст (18 страна на почетку и 5 страна на крају) обухвата: насловне стране на српском и енглеском језику, листу ментора и чланова комисије, изјаву захвалности, сажетке на српском и енглеском језику, листу скраћеница, садржај, биографију аутора, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

У докторској дисертацији кандидат Милош М. Ђорђевић је анализирао молекуларне механизме антиоксидативног и протективног дејства екстракта кичице који доприносе очувању структуре и функције β -ћелија панкреаса и ублажавању компликација у експерименталном моделу дијабетеса пацова.

У **Уводу** своје докторске дисертације кандидат је кроз 4 потпоглавља детаљно приказао литературне податке који подржавају проблематику докторске дисертације. У оквиру потпоглавља *Дијабетес* описани су типови дијабетеса и патофизиолошки процеси који се налазе у основи развоја болести а на основу којих је и извршена подела на категорије. Описан је механизам двофазне секреције хормона инсулина од стране β -ћелија панкреаса и његова улога у регулацији нивоа глукозе у циркулацији. Детаљно је описана улога PDX-1 и MafA протеина у регулацији експресије и секреције инсулина у β -ћелијама, као и улога Akt, ERK и p38 киназа у регулацији сигналних путева преживљавања у ћелији и очувању масе β -ћелија. У оквиру потпоглавља *Оксидативни стрес у дијабетесу*

кандидат најпре објашњава појмове оксидативног стреса и слободних радикала и представља поделу слободних радикала на реактивне врсте кисеоника и реактивне врсте азота, уз освртање на механизме којим свака од наведених врста настаје у ћелији. Кандидат затим описује штетне последице повећаног нивоа слободних радикала у ћелији на молекуле ДНК, липида и протеина. Посебну пажњу кандидат је посветио објашњавању улоге коју оксидативни стрес има у нарушавању структуре и функције β -ћелија панкреаса као и развоју компликација у дијабетесу, са акцентом на оксидативна оштећења еритроцита, јетре и бубрега. У потпоглављу *Ендогени систем антиоксидативне заштите* дат је преглед ензимских (супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GR)) и неензимских (глутатион - GSH) антиоксиданаса чију је активност и присуство кандидат пратио у оквиру своје дисертације. Детаљно је објашњена улога NF κ B, Nrf-2, Sp1 и FOXO протеина у регулацији транскрипције гена за поменуте ензиме антиоксидативне заштите. У оквиру потпоглавља *Употреба антиоксиданаса и биљних препарата у третману дијабетеса* кандидат најпре излаже предности и недостатке употребе егзогенних антиоксиданаса (витамина Е и Ц, коензима Q-10, алфа липоинске киселине) у третману дијабетеса, а затим истиче да, имајући у виду резултате клиничких студија, употреба појединачних антиоксиданаса у третману болести не може заменити конзумирање хране богате смешом различитих полифенолних једињења као најзаступљенијих природних антиоксиданаса у људској исхрани. У завршном делу уводног поглавља кандидат указује да је употреба биљних препарата (фитотерапеутика) у третману дијабетеса у експанзији због њихове ефикасности, мање нежељених ефеката као и због значајно нижих трошкова и наводи најзначајније биљке које се традиционално користе у лечењу дијабетеса. Коначно, кандидат описује биљку кичицу (*Centaurium erythraea* Rafn) која се у Србији користи за лечење бројних болести, укључујући и дијабетес, и даје детаљан преглед литературе у вези са њеним антидијабетогеним и антиоксидативним својствима.

У поглављу **Хипотеза и циљеви истраживања** кандидат полази од чињенице да су резултати савремене терапије дијабетеса, која подразумева употребу инсулина и лекова са хипогликемијским дејством као и корекцију исхране, и поред значајног напретка далеко од очекиваних, и да је стога неопходно побољшање актуелне терапије. Имајући у виду улогу оксидативног стреса у нарушавању структуре и функције β -ћелија и развоју

пратећих компликација као и чињеницу да биљни препарати садрже сложену комбинацију полифенолних једињења која међусобним синергистичким, антагонистичким и адитивним интеракцијама могу допринети одбрани од оксидативног стреса, кандидат истиче да исхрана обogaћена биљним полифенолима може у великој мери да утиче на превенцију и ублажавање симптома дијабетеса. Кичица је биљка која се традиционално користи за лечење дијабетеса и у чијем су саставу идентификована бројна биолошки активна једињења која испољавају антидијабетогена и антиоксидативна својства. Истраживања су показала да третман екстрактом кичице смањује оксидативни стрес и оштећења β -ћелија панкреаса код животиња са експериментално изазваним дијабетесом. С' обзиром да су механизми оваквог ефекта кичице још увек непознати, кандидат као главни циљ ове докторске дисертације поставља расветљавање молекуларних механизма антиоксидативног и протективног дејства екстракта кичице који доприносе очувању структуре и функције β -ћелија панкреаса и ублажавању компликација у експерименталном моделу дијабетеса пацова. Сходно општем циљу, кандидат поставља и специфичне циљеве истраживања и то: карактеризацију фитохемијског састава екстракта кичице (ЕК) и анализу антиоксидативног потенцијала ЕК у *in vitro* условима; испитивање утицаја ЕК на системски оксидативни стрес код пацова на модел систему дијабетеса изазваном вишекратним инјектирањем раствора стрептозотоцина (STZ); испитивање антиоксидативног ефекта ЕК у јетри и бубрегу дијабетичних пацова; испитивање ефекта ЕК на структурне и функционалне параметре Лангерхансових острваца дијабетичних пацова; испитивање протективног ефекта ЕК на Rin-5F β -ћелије у условима оксидативног стреса изазваног применом водоник пероксида (H_2O_2), натријум нитропрусида (SNP) и STZ-a; испитивање утицаја ЕК на активност регулатора транскрипције гена за ензиме антиоксидативне заштите и испитивање ефекта ЕК на регулаторне механизме укључене у путеве преживљавања као и секрецију инсулина унутар β -ћелија.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно и систематично су приказани експериментални протоколи и методолошки приступи који су коришћени у овој докторској дисертацији као и све хемикалије и апаратуре коришћене у раду. Ово поглавље је подељено на 16 потпоглавља од којих су нека додатно подељена. Кандидат најпре наводи локалитет на коме је прикупљен биљни материјала и описује припрему метанолног екстракта кичице. Затим описује поступак одређивања садржаја укупних фенола и

флавоноида у добијеном екстракту и детаљно објашњава квалитативну и квантитативну анализу екстракта употребом UHPLC-qqqMS система. Антиоксидативни потенцијал ЕК у *in vitro* експерименталним условима кандидат је утврдио испитивањем способности неутрализације H_2O_2 и азот оксида (NO^*), испитивањем способности неутрализације $DPFH^*$ радикала и хелације гвожђа као и испитивањем редукујућег потенцијала екстракта. Кандидат затим детаљно описује дизајн експеримента и поступке руковања експерименталним животињама у складу са етичким начелима Европске комисије за заштиту животиња 2010/63/EУ и одобрењем Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (број решења 2-14/10). У експериментима су коришћени албино мужјаци пацова соја *Wistar* старости 2,5 месеца. Животиње су биле подељене у пет експерименталних група: контролна група (К); контролна група третирана екстрактом (100 мг/кг/дан) (К/ЕК); дијабетична група животиња (Д) код којих је дијабетес изазиван интраперитонеланим инјектирањем раствора STZ-а (40/мг/кг/дан) током пет узастопних дана; посттретирана група (Д/ЕК) у којој су дијабетичне животиње третиране ЕК током четири недеље од последње дозе STZ-а; преттретирана група (ЕК/Д/ЕК) у којој су животиње код којих је третман ЕК почео две недеље пре прве дозе STZ-а, трајао током изазивања дијабетеса и још четири недеље након последње дозе STZ-а. У оквиру овог дела детаљно су описани протоколи у вези са следећим поступцима и методама: припрема серума и еритроцита, изолација и припрема органа, биохемијска анализа серума, одређивање концентрације хемоглобина (Hb) и гликозилованог хемоглобина (GlyHb) у еритроцитима, одређивање концентрације инсулина у серуму, одређивање крајњих производа гликације у серуму, хистолошка анализа ткива. Потом су систематично приказани сви поступци и процедуре у вези са радом кандидата у ћелијској култури. Као материјал у *in vitro* експериментима коришћена је ћелијска линија β -ћелија инсулинома пацова Rin-5F (ATCC[®] CRL-2058). Ове ћелије се карактеришу активном синтезом и секрецијом инсулина па су као такве погодне за испитивање механизма укључених у транскрипциону регулацију гена за инсулин. Кандидат је у овом делу детаљно описао третмане ћелија (оксидативни стрес изазиван применом IC_{50} доза H_2O_2 , SNP-а и STZ-а) и испитивање ефекта ЕК на преживљавање третираних ћелија применом МТТ теста, затим припрему узорака за различите есеје којим је испитиван ефекат ЕК на редокс статус Rin-5F ћелија третираних одабраним агенсима (испитивање нивоа липидне пероксидације

и нивоа оштећења ДНК, испитивање односа редукованог и оксидованог глутатиона (GSH/GSSG) и нивоа С-глутатиониланих протеина (GSSP) као и одређивање активности ензима антиоксидативне заштите), процедуру за изолацију укупне РНК и синтезу комплементарне ДНК, као и поступке припреме укупних ћелијских лизата и једарних фракција ћелија. У наредним потпоглављима кандидат је детаљно описао протоколе за следеће методе: одређивање концентрације протеина; одређивање нивоа липидне пероксидације; одређивање степена оштећења ДНК; одређивање односа GSH/GSSG; одређивање нивоа GSSP; одређивање активности ензима антиоксидативне заштите (SOD, CAT, GPx, GR); имуноблот анализа протеина; квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (RT-qPCR). На крају овог поглавља представљена је статистичка метода (једносмерна анализа варијансе (one-way ANOVA) праћена Бонферони тестом (*Bonferroni's Multiple Comparison Test*)) коришћена за обраду добијених резултата.

У оквиру поглавља **Резултати** кандидат је јасно и прегледно изнео добијене експерименталне резултате које је, у складу са постављеним циљевима, поделио у 5 целина и приказао на 23 слике и у 9 табела. У првој целини је представљена анализа хемијског састава метанолног екстракта припремљеног од надземних делова кичице (ЕК). Квалитативна и квантитативна карактеризација екстракта показала је да секоиридоиди (сверцијамарин, сверозид, генциопикрин, логанин и секологанин) и полифеноли (укључујући ксантоне (деметилеустомин, метилбелидифолин, еустомин, декусатин), фенолне киселине (ферулинска, *p*-кумарна, кафеинска, синапинска киселина) и флавоноиде (рутин, апигенин, кверцетин, нарингенин, изокверцитрин, астрагалин, лутеолин, кемпферол)) чине најзаступљеније компоненте екстракта. Испитивањем антиоксидативног потенцијала ЕК утврђено је да екстракт испољава снажну антиоксидативну активност у *in vitro* условима. Детектована способност неутрализације H_2O_2 и NO^\bullet је у свим испитиваним концентрацијама екстракта била већа од стандардних супстанци док је, у поређењу са референтном аскорбинском киселином, ЕК испољио нижу способност неутрализације DPPH $^\bullet$ радикала. Са порастом концентрације екстракта расли су и редукујући потенцијал и способност хелације гвожђа али су у свим испитиваним концентрацијама вредности биле ниже од вредности добијених применом референтних супстанци. У наредној целини приказан је утицај ЕК на системски оксидативни стрес код пацова у условима дијабетеса. У оквиру ове целине кандидат најпре приказује утицај ЕК

на промену телесне масе дијабетичних животиња као и на основне биохемијске параметре карактеристичне за дијабетес. Имајући у виду да еритроцити први одговарају на повишен ниво оксидативног стреса у условима хипергликемије и да степен њиховог оштећења одражава системски оксидативни стрес, кандидат је испитивао и ефекат ЕК на структурне и функционалне параметре еритроцита. Четири недеље након изазивања дијабетеса код Д групе су забележени типични симптоми болести: губитак телесне масе праћен порастом нивоа глукозе, GlyHb, триглицерида, ЛДЛ холестерола и падом нивоа инсулина у циркулацији. Поред тога, дијабетес је узроковао поремећај у одржавању редокс равнотеже у еритроцитима. Код дијабетичних животиња је уочен повећан степен гликозилације и оксидације протеина, повећан ниво липидне пероксидације као и поремећај у ендогеном систему антиоксидативне заштите еритроцита (смањење односа GSH/GSSG, снижене активности CAT, CuZnSOD i GR). Редовни унос ЕК смањивао је концентрацију глукозе и повећао ниво инсулина у циркулацији што је било удружено са смањењем нивоа триглицерида и ЛДЛ холестерола и ублаженим губитком телесне масе. Такође, редовни унос ЕК код дијабетичних животиња је смањивао степен оксидативних оштећења еритроцита и побољшао њихов антиоксидативни потенцијал, што је било праћено смањењем нивоа гликације/гликозилације протеина у еритроцитима. Додатно, ЕК је повећао активност Akt киназе у еритроцитима и смањивао ниво $\alpha 2$ макроглобулина у серуму дијабетичних животиња. Сигнални пут PI3K/Akt је укључен у регулацију деформабилитета еритроцита који представља особину еритроцита да се провуку кроз уске капиларе без оштећења, док је повећани ниво $\alpha 2$ макроглобулина у позитивној корелацији са агрегацијом еритроцита. Кандидат истиче да ови резултати упућују на то да примена ЕК може смањити вискозност крви и тиме допринети побољшању микроциркулације у дијабетесу, чиме би се обезбедила адекватна оксигенација ткива и органа и ублажио развој пратећих компликација. Имајући то у виду, кандидат у наредном поглављу приказује протективно деловање ЕК на прогресију оштећења јетре и бубрега у дијабетесу. Примена ЕК је значајно смањила концентрације аспартат- и аланин аминотрансфераза (AST и ALT), азота урее у крви (BUN) и креатинина (параметара чије повећање уочено код дијабетичних животиња указује на поремећај функционисања ових органа) и смањила релативне масе органа које су биле повећане код дијабетичних животиња. Такође, ЕК је смањивао оштећење молекула ДНК и ниво липидне пероксидације

у јетри и бубрегу дијабетичних животиња. Додатно, примена ЕК је повећала однос GSH/GSSG, што је корелисало са смањењем присуства С-глутатионилованих протеина у овим органима. Третман дијабетичних животиња ЕК побољшао је ендогени систем антиоксидативне заштите у јетри и бубрегу. Смањене активности CAT, MnSOD, CuZnSOD, GPx и GR уочене у јетри дијабетичних животиња су се повећале након третмана ЕК. Поред тога, примена ЕК је повећала активности CAT, MnSOD и CuZnSOD које су биле смањене у бубрегу Д животиња и смањила повећане активности GPx и GR. Треба напоменути да је позитиван ефекат примене ЕК израженији код претретиране групе дијабетичних животиња.

Како се дијабетес карактерише прогресивним губитком броја и функције β -ћелија панкреаса, у наредном поглављу приказан је утицај ЕК на β -ћелије у условима дијабетеса. У оквиру ове целине кандидат најпре приказује хистолошку и имунохистохемијску анализу структурних и функционалних параметара Лангерхансових острваца и констатује да ЕК доприноси очувању морфологије острваца и повећава масу β -ћелија, што доприноси повећаној производњи инсулина код дијабетичних пацова. Такође, третман ЕК је повећао присуство транспортера глукозе GLUT-2, као и активне, фосфорилисане форме Akt (p-Akt) киназе у острвцима дијабетичних животиња. Позитиван ефекат третмана ЕК на показатеље структурних и функционалних карактеристика ендокриног панкреаса код дијабетичних пацова отворио је могућност испитивања молекуларних механизма протективног дејства екстракта у β -ћелијама. Испитивање молекуларних механизма антиоксидативног и протективног дејства ЕК урађено је *in vitro*, на Rin-5F ћелијској линији инсулинома β -ћелија пацова. Имајући у виду да је испитиван протективни ефекат ЕК у условима оксидативног стреса изазваног применом различитих агенаса (H_2O_2 , SNP, STZ), кандидат је ову целину додатно поделио на више одељака како би се лакше пратили резултати добијени за појединачне третмане. У сваком од одељака, кандидат најпре приказује утицај ЕК на преживљавање и функционалност Rin-5F ћелија (одређивањем нивоа иРНК за инсулин и количине инсулина ослобођеног у медијум), затим анализу параметара оксидативног стреса (степен оштећења ДНК, ниво липидне пероксидације, однос GSH/GSSG, ниво GSSP и активност ензима антиоксидативне заштите) и на крају утицај ЕК на експресију ензима антиоксидативне заштите (ниво иРНК и протеина). Примена ЕК након третмана IC_{50} дозама поменутих агенаса је: повећала преживљавање

Rin-5F ћелија; повећала ниво иРНК за инсулин и количину ослобођеног инсулина; смањила оштећење молекула ДНК; смањила ниво липидне пероксидације; смањила ниво GSSP; повећала однос GSH/GSSG (са напоменом да повећање након SNP- и STZ-третмана није било статистички значајно). ЕК је утицао и на активност ензима антиоксидативне заштите која је била поремећена након третмана одабраним прооксидансима. Смањена активност CAT, GPx и GR након третмана SNP-ом, односно GPx и GR након третмана H₂O₂, била је повећана након котретмана ћелија екстрактом. Са друге стране, повећање активности CAT након H₂O₂ и STZ третмана, GR након STZ третмана, односно MnSOD и CuZnSOD након свих третмана било је редуковано након примене ЕК. Поред тога, третман ЕК је модулисао и експресију ензима антиоксидативне заштите. Нивои иРНК и протеина за GPx и MnSOD, који су били повећани након третмана Rin-5F ћелија H₂O₂ смањили су се након котретмана екстрактом. Иако није забележена промена на нивоу иРНК за GR, ниво GR протеина, који је био повећан након H₂O₂ третмана, смањено се у H₂O₂/ЕК котретману. Нивои иРНК за све испитиване ензиме били су повећани након SNP третмана. Котретман SNP/ЕК смањено је ниво иРНК за CAT, GPx и CuZnSOD, док су нивои иРНК за GR и MnSOD остали повишени. Након SNP третмана је забележено повећање нивоа протеина за CAT, GPx, GR и MnSOD. SNP/ЕК котретман је смањено ниво CAT и MnSOD протеина. Повећање нивоа иРНК свих испитиваних ензима забележено је и након STZ третмана. Осим тога, уочен је и повећани ниво CAT, GR, MnSOD и CuZnSOD протеина. Котретман STZ/ЕК је смањено ниво иРНК за CAT, GPx, MnSOD и CuZnSOD али и ниво CAT протеина.

Имајући у виду да оксидативни стрес утиче на стабилност, ћелијску расподелу и активност протеина и да се стога у условима оксидативног стреса који прати дијабетес могу очекивати и промене у активности регулаторних протеина укључених у процес транскрипције и сигналне путеве преживљавања у ћелији, кандидат у наредном делу приказује утицај ЕК на регулаторне процесе у β-ћелијама у условима оксидативног стреса, тачније утицај ЕК на активност фактора укључених у регулацију транскрипције гена за ензиме антиоксидативне заштите као и утицај ЕК на регулаторе сигналних путева преживљавања и експресије/секреције инсулина у β-ћелијама. С' обзиром да је STZ коришћен за изазивање експерименталног модела дијабетеса код пацова, ефекат ЕК на регулаторне механизме који се активирају у условима оксидативног стреса испитиван је

на Rin-5F ћелијама третираним STZ-ом. Имуноблот анализом једарних фракција ћелија најпре је испитано присуство NFκB-p65, FOXO3A, Sp1 и Nrf-2, фактора за које је познато да регулишу транскрипцију гена за ензиме антиоксидативне заштите. Након третмана STZ-ом уочено је повећање нивоа фосфорилисане форме NFκB-p65 (p-NFκB-p65), повећање нивоа FOXO3A и Nrf-2 као и смањење нивоа Sp1. Након STZ/ЕК котретмана ниво p-NFκB-p65 и Nrf-2 је био смањен у односу на STZ третман, док је ниво Sp1 био повећан. Како би утврдио ефекат ЕК на сигналне путеве укључене у процесе апоптозе, преживљавања и експресије инсулина у β-ћелијама у условима оксидативног стреса, кандидат је испитао активност Akt, ERK и p38 киназа у лизатима као и ниво PDX-1 и MafA транскрипционих регулатора у једарним фракцијама Rin-5F ћелија третираних STZ-ом у одсуству/присуству ЕК током 4h, 6h, 8, 12h и 24h. Имуноблот анализом ћелијских лизата уочене су динамичне промене у присуству фосфорилисаних (активних) форми Akt (p-Akt), ERK (p-ERK) и p38 (p-p38) киназа. Активност Akt киназе након STZ третмана била је повишена у односу на контролу почевши од 6h третмана, док је котретман STZ/ЕК додатно повећао активност Akt киназе након 6h и 24h. Активност ERK киназе је у свим временским тачкама била повећана након третмана ћелија и била је константно већа у STZ/ЕК котретману у поређењу са одговарајућим STZ третманом. Са друге стране, активност p38 киназе била је повећана 4h и 6h након третмана STZ-ом док се у каснијим временским тачкама није разликовала од контролних вредности. STZ/ЕК котретман је додатно повећао активност p38 након 6h. Додатно, активност p38 киназе у STZ/ЕК котретману била је повећана након 8h и 12h у односу на STZ третман. У поређењу са контролним ћелијама, ниво PDX-1 у једрима ћелија је био смањен у свим испитиваним временским тачкама, како у третману STZ-ом, тако и у котретману STZ/ЕК. Међутим, у поређењу са одговарајућим STZ третманом, ниво PDX-1 је био већи након котретмана ћелија STZ/ЕК након 8h, односно 12h. За разлику од PDX-1, детектовано је пролазно повећање нивоа MafA протеина у једрима Rin-5F ћелија. Третман STZ-ом је повећао ниво MafA након 6h, 8h и 12h, док је у котретману STZ/ЕК ниво овог протеина био додатно повећан након 6h и 8h.

У поглављу **Дискусија** представљена је упоредна анализа приказаних резултата и релевантних података објављених у научној литератури. На основу текста у овом поглављу може се закључити да кандидат добро познаје проблематику истраживања

приказаног у овој докторској дисертацији. Поглавље Дискусија је отворено разматрањем фитохемијског састава и антиоксидативног потенцијала ЕК. Кандидат констатује да секоиридоидни гликозиди, који су идентификовани као најдоминантнија једињења присутна у екстракту, поседују широк спектар биолошког дејства, укључујући антифунгицидно, антибактеријско, гастропротективно, хепатопротективно, седативно и антитуморско. Са друге стране, полифенолна једињења идентификована у ЕК поседују јака антиоксидативна својства. Имајући то у виду, кандидат детектовану антиоксидативну активност ЕК у *in vitro* условима приписује присуству полифенолних једињења. У потпоглављу *Екстракт кичице побољшава биохемијске параметре дијабетеса*, кандидат детаљно објашњава хипогликемијски и хиполипидемијски ефекат ЕК и доводи их у везу са једињењима идентификованим у екстракту. Кандидат у наредном поглављу дискутује о утицају ЕК и његових компоненти на смањење системског оксидативног стреса и очување структурних и функционалних параметара еритроцита и наводи да примена ЕК може допринети побољшању микроциркулације у дијабетесу чиме би се обезбедила адекватна оксигенација ткива и органа. С' обзиром да се омогућавањем адекватне исхране ткива и органа може смањити ризик за развој компликација које прате дијабетес, наредно поглавље је посвећено дискутовању утицаја ЕК на ублажавање оксидативног стреса и очување функције јетре и бубрега дијабетичних пацова. Кандидат констатује да се протективни ефекат ЕК на функционисање јетре и бубрега код дијабетичних животиња може приписати удруженом деловању различитих механизма посредованим екстрактом, од хипогликемијског и антиоксидативног дејства па до утицаја на транскрипционе и посттранскрипционе механизме регулације активности ензима антиоксидативне заштите. Поглавље Дискусија завршава се детаљним разматрањем утицаја ЕК и појединачних компоненти на молекуларне механизме укључене у преживљавање и функционалност β -ћелија панкреаса. Очувањем структуре и функције Лангерхансових острваца панкреаса ЕК доприноси повећању нивоа инсулина и бољој контроли гликемије. Протективно дејство на β -ћелије панкреаса у условима оксидативног стреса ЕК остварује деловањем на различите нивое регулаторних механизма: директном неутрализацијом слободних радикала; смањењем оксидативних оштећења ДНК, липида и протеина и повећањем односа GSH/GSSG; модулисањем активности и експресије ензима антиоксидативне заштите (CAT, GPx, GR, MnSOD, CuZnSOD); уравнотежавањем присуства и активности

редокс-сензитивних транскрипционих регулатора NFκB, Nrf-2, Sp1 и FOXO3A, укључених у регулацију транскрипције гена за ензиме антиоксидативне заштите; активацијом Akt, ERK и p38 киназа чиме подстиче процесе пролиферације и преживљавања β-ћелија и доприноси очувању масе β-ћелија и побољшању експресије и секреције инсулина.

У поглављу **Закључци** сумирани су и јасно наведени резултати добијени у овој докторској дисертацији.

У поглављу **Литература** наведено је 470 библиографских јединица, што указује да је кандидат темељно и студиозно приступио изучавању проблематике докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ђорђевић, М.**, Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Grdović, N., Uskoković, A., Tolić, A., Sinadinović, M., Rajić, J., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2017. Centaurium erythraea methanol extract protects red blood cells from oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 202, 172-183. **M21a.** <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.016>
2. **Ђорђевић, М.**, Grdović, N., Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Uskoković, A., Rajić, J., Sinadinović, M., Tolić, A., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2019. Centaurium erythraea extract improves survival and functionality of pancreatic beta-cells in diabetes through multiple routes of action. J Ethnopharmacol 242, 112043. **M21.** <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112043>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Ђорђевић, М.**, Dinić, S., Grdović, N., Mihailović, M., Arambašić-Jovanović, J., Uskoković, A., Tolić, A., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., 2015. Centaurium erythraea extract improves redox-status and antioxidant enzyme activity of STZ-treated pancreatic beta-cells and diabetic rat liver and kidney, Joint Meeting of 2nd International Conference on Plant Biology, 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, COST ACTION FA1106 QUALITYFRUIT Workshop. Serbian Plant Physiology Society and Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, Serbia, Petnica Science Center, p. 67. **M34**
2. **Ђорђевић, М.**, Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Grdović, N., Uskoković, A., Sinadinović, M., Rajić, J., Tolić, A., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2018.

Centaurium erythraea Methanol Extract Attenuates SNP-Induced Oxidative Stress in Pancreatic B-Cells, 3rd European Summer School on Nutrigenomics, Jesi, Italy, p. 7. **M34**

3. **Dorđević, M.**, Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Grdović, N., Uskoković, A., Sinadinović, M., Rajić, J., Tolić, A., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2018. Protective effect of Centaurium erythraea methanol extract against oxidative challenge in red blood cells of diabetic rats, Towards a Redox Healthy Aging - WGs Meeting of the NutRedOx COST Action CA16112. Palma, Mallorca, p. 23. **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Милоша М. Ђорђевића послата је дана 24.06.2019. год. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 25.06.2019. год.

Извештај провере оригиналности докторске дисертације Милоша М. Ђорђевића добијен коришћењем програма *iThenticate* у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“, показао је индекс сличности од 14%. Увидом у Извештај утврђено је да су подударна углавном резултат употребе општих појмова, личних имена, научних звања и установа, као и библиографских података о коришћеној литератури. Поред тога, утврђена је подударност код назива хемикалија и протеина, назива биљака које се традиционално користе у третману дијабетеса, као и неких скраћеница, али се они као такви не могу изменити. Одређен проценат подударна утврђен је у оквиру поглавља Материјал и методе где су наведени пуфери дефинисаног састава као и стандардизовани поступци експерименталних метода. Додатно, у оквиру поглавља Резултати уочено је подударње услед коришћења стандардних ознака за статистичку значајност. Наведени извештај је указао на оригиналност докторске дисертације кандидата те се прописани поступак припреме за њену одбрану наставио сходно томе.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију **Милоша М. Ђорђевића**, Комисија са задовољством констатује да приказани резултати дају важан научни допринос разумевању молекуларних механизма антиоксидативног и протективног дејства ЕК и његових компоненти који доприносе очувању структуре и функције β -ћелија панкреаса и ублажавању компликација у дијабетесу. Гледано у целини, разумевање ових механизма

отвара нове могућности за потенцијална терапијска деловања у идентификованим критичким тачкама. Кандидат је показао добро познавање литературе и проблематике релевантне научне области, као и висок степен истраживачке зрелости.

О резултатима добијеним у оквиру овог истраживања, интерпретацији и значају истих додатно говори податак да су објављени, кроз две публикације, у врхунском међународном часопису (M21) у области интегративне и комплементарне медицине.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације Милоша М. Ђорђевића, под насловом „**Молекуларни механизми антиоксидативног дејства екстракта кичице (*Centaurium erythraea Rafn*) у експерименталном моделу дијабетеса пацова**“, као и број и квалитет научних радова који су објављени на основу добијених резултата дисертације, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидата Милоша М. Ђорђевића.

КОМИСИЈА:

У Београду, 22.07.2019. године

др Мелита Видаковић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић
Универзитет у Београду

др Светлана Динић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић
Универзитет у Београду

др Гордана Матић, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду