

Биолошки факултет
Број захтева: 33/201-1
Датум: 11.9.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Немања С. Станисављевић**

студент докторских студија на студијском програму Молекуларна биологија, Молекуларна биологија еукариота.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 26.03.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1253/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 15.05.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/104-15.05.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Светлана Радовић	редовни професор	биохемија и молекуларна биологија	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
2.	др Живко Јовановић	научни сарадник	молекуларна биологија	Универзитет у Београду - Институт за медицинску генетику и генетичко инжењерство
3.	др Маја Матић	доцент	аналитичка хемија	Универзитет у Београду- Хемијски факултет
4.	др Ивана Матић	научни сарадник	молекуларна биологија	Институт за онкологију и радиологију Србије

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 11. септембра 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/201-11.9.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на X редовној седници одржаној 11.9.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Немање Станисављевића, под називом:

„Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)“.

Универзитет је дана 26.03.2015. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1253/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Stanisavljević, N., Jovanović, Ž., Čupić, T., Lukić, J., Miljuš-Đukić, J., Radović, S., Mikić, A. (2013): Extractability of antioxidants from legume seed flour after cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion in comparison with methanolic extraction of the unprocessed flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 48:2096-2104. **(M22)**

Stanisavljević, N., Ilić, M., Jovanović, Ž., Čupić, T., Dabić, D., Natić, M., Tešić, Ž., Radović, S. (2015) Identification of seed coat phenolic compounds from differently colored pea varieties and characterization of their antioxidant activity. *Archives of Biological Sciences* doi:10.2298/ABS141204042S (M23)

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 15.05.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Светлане Радовић и др Живка Јовановића о урађеној докторској дисертацији **Немање С. Станисављевића**, истраживача сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, под насловом „**Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)**”, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

- др Светлана Радовић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет
- др Маја Натић, доцент, Универзитет у Београду - Хемијски факултет
- др Живко Јовановић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
- др Ивана Матић, научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Немање С. Станисављевића** под називом „**Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)**”, урађена је у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду у Лабораторији за молекуларну биологију биљака.

Рад је написан на укупно 143 стране и организован у седам основних поглавља: Увод (52 стране), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (14 страна), Резултати (32 стране), Дискусија (24 страна), Закључци (3 стране) и Литература (17 страна, 164 библиографске јединице). На последњој страни је дата кратка биографија кандидата. Дисертација садржи 48 слика и 14 табела.

Анализа докторске дисертације:

Тема и објекат изабрани за ову дисертацију су у тесној су вези са истраживачким програмом Лабораторије за молекуларну биологију биљака у којој је докторант запослен. Породица махунарки (*Fabaceae*), која је у центру научног интересовања лабораторије, обилује економски и пољопривредно значајним врстама међу којима се по заступљености гајења у Србији издваја грашак (*Pisum sativum* L.) са уделом од 4,5% у укупној повртарској производњи. Ова култура се првенствено користи као богат извор протеина у хуманој и анималној исхрани. Семењаче грашка, посебно генотипова са изразито пигментисаним тамним семенима представљају значајан извор фенолних једињења, чији су састав и биолошке активности недовољно испитани, те стога ни потенцијал овог материјала није довољно искоришћен. Семењаче грашка чине и до 10% суве масе семена и углавном представљају отпадни материјал који настаје у процесу индустријске изолације протеина семена који се користе у хуманој и анималној исхрани. Претходне студије фенолног састава европских варијетета грашка су ограничене на веома мали број комерцијалних култивара, а поготово недостају подаци о варијететима са пигментисаним и тамно обојеним семењачама који су са мањим уделом заступљени у хуманој исхрани услед неодговарајућих сензоричких карактеристика, те се интензивније користе у исхрани животиња. Узимајући у обзир да су претходна истраживања фенолног састава семењача грашка као и испитивања њихове биолошке и фармаколошке активности веома оскудна и ограничена на мали број варијетета, Немања Станисављевић је усмерио своја истраживања на квалитативну и квантитативну анализу фенолног састава семењача одабраних европских варијетета грашка као и на *in vitro* анализу потенцијалне антиоксидативне, антихипертензивне и антитуморске активности течних екстраката семењача. Такође је проучаван и утицај термичке обраде и *in vitro* дигестије на принос фенолних једињења у екстрактима и њихиву биолошку активност. У експериментима су коришћени генотипови грашка са различито обојеним семењачама прикупљени из шест држава јужне, централне и северне Европе који се користе у укрштању а неки од њих су признате комерцијалне сорте и култивари. У току израде докторске дисертације Немања Станисављевић је дефинисао услове за успостављање најпогоднијег система за екстракцију фенолних једињења из семењача грашка што је омогућило добијање екстраката са високим приносима фенолних једињења који су даље коришћени за квалитативну и квантитативну анализу као и за одређивање биолошких активности. Један од сегмената истраживања је обухватио и проучавање утицаја термичког третмана и *in vitro* дигестије на принос фенолних једињења у екстрактима и њихову биолошку активност. С обзиром на то да се данас посвећује све више пажње употреби функционалне хране у превенцији многих обољења, и да се паралелно развијају многобројни технолошки поступци који омогућавају максимално искоришћење споредних продуката прехранбене индустрије који садрже биолошки активне компоненте, истраживање Немање Станисављевића представља вредан прилог истраживању значајне биљне сировине чији потенцијал није у потпуности искоришћен.

У Уводу дисертације дат је детаљан преглед литературе са подацима о фенолном саставу претходно испитиваних генотипова грашка, са освртом на забележене биолошке активности како појединачних фенолних једињења тако и различитих екстраката семена грашка. Посебан акценат стављен је на антиоксидативне и антитуморске активности. Разматран је и ефекат примене различитих термичких третмана и *in vitro* дигестије на биолошку расположивост фенолних једињења и њихове биолошке активности. У другом

делу увода представљене су карактеристике и значај грашка као повртарске културе са посебним освртом на примену у функционалној исхрани. Уводни део садржи и друге податке релевантне за резултате који су добијени.

У поглављу **Циљ рада** изложени су научни циљеви и експериментални дизајн докторске дисертације:

- Основни циљ овог рада био је одређивање састава фенолних једињења одабраних генотипова грашка са различито пигментисаним семењачама и испитивање њихових биолошких активности са акцентом на антиоксидативне и антитуморске активности ових једињења.
- Поред поменутог, један од циљева је и било испитивање утицаја примењеног растварача, термичког третмана и *in vitro* дигестије на принос фенолних једињења у екстрактима и њихове антиоксидативне активности.

Добијени резултати би требало да омогуће идентификацију генотипова који би могли бити употребљени у функционалној исхрани или искоришћени за укрштање у циљу добијања нових генотипова са повишеним садржајем фенолних једињења.

У поглављу **Материјал и методе** јасно и детаљно су описани сви коришћени поступци и методи у реализацији наведених циљева. На почетку су описане методе за екстракцију фенолних једињења из целих семена и семењача грашка, поступци за термичку обраду и *in vitro* дигестију семена методе за одређивање *in vitro* антиоксидативних активности екстраката. Потом следе описи UHPLC–LTQ OrbiTrap MS технике за одређивање састава фенолних једињења, методе за одређивање цитотоксичности и дистрибуције хелија по фазама хелијског циклуса помоћу проточне цитометрије, као и методе за детекцију унутархелијских реактивних врста кисеоника. Такође је наведен и опис методе за процену способности *in vitro* инхибиције ангиотензин конвертујућег ензима. Наведене су и статистичке анализе које су коришћене у анализи нумеричких података који су добијени у овом раду.

Поглавље **Резултати** састоји се из неколико целина. У првом делу приказани су резултати који се односе на испитивање утицаја примењеног растварача, термичког третмана и *in vitro* дигестије на принос фенолних једињења у екстрактима. Показано је да термички третман и *in vitro* дигестија доводе до статистички значајног повећања садржаја фенолних једињења како у воденим екстрактима тако и у екстрактима припремљеним помоћу органског растварача. Утврђено је и да пептиди који настају током *in vitro* дигестије протеина грашка могу значајно интерферирати са тестовима за одређивање антиоксидативне активности, поготово у воденим екстрактима семена грашка, пошто и сами поседују детектабилне антиоксидативне активности. Показано је да је комбинација растварача која садржи 70% ацетона, 29% дестиловане воде и 1% сирћетне киселине најподесније средство за екстракцију укупних фенола из семењача грашка, дајући највећи принос како код генотипа са бледом, тако и код генотипова са изразито тамно пигментисаном семењачом. Садржај укупних фенола у екстрактима добијеним применом поменутог растварача се код појединих генотипова (Assas, MBK 168 и Aslaug) кретао у опсегу 41,8-46,6 mg GAE/ g s.m., што је највиши до сада забележени садржај укупних фенола код неког генотипа грашка и по вредностима је близак садржају укупних фенола у семенима варијетета црне соје (*Glycine max*). Екстракти истих генотипова су уједно садржали највише танинских материја и показивали су најизраженије способности уклањања DPPH радикала и редукције Fe³⁺ јона.

У другој целини су приказани резултати идентификације и квантификације појединачних фенолних једињења UHPLC–LTQ Orbitrap MS техником. Анализирани су екстракти семењача припремљених помоћу поменутог растварача (ацетон/вода/сирћетна киселина) као и екстракти добијени кувањем у дестилованој води. Водени екстракти су коришћени у свим есејима који су укључивали третман ћелија екстрактима, што је рађено да би се избегао токсични ефекат растварача на ћелије. Током анализе ацетонских екстраката идентификовано је 25 фенолних једињења, том приликом је детектовано 9 једињења чије присуство није до сада забележено у семењачама грашка. Први пут је детектовано присуство флаванона хризина, хесперетина, нарингенина и нарингина, који би поред танинских материја могли бити одговорни за изражену горчину код тамно обојених генотипова. Поред флаванона први пут су детектована и два флаванола катехин галат и галокатехин галат, при чему није било корелација између боје семена и дистрибуције ових једињења међу генотиповима. Такође је забележено и присуство мориана, галангина и рузмаринске киселине у мањим количинама код већине генотипова. Анализа главних компонената (РСА) је показала да се на основу садржаја појединачних фенолних једињења као и антиоксидативних активности екстраката испитивани генотипови могу сврстати у две главне групације. Прву групу чине генотипови са бледо пигментисаним семењачама Golf, Törsz i MBK 88 а у другој групи се налазе генотипови са тамном Aslaug, Assas, Dora, Poneka, MBK 168 i MBK 173, док је генотип MBK 90 био ван група. Оно што је значајно истаћи је да расподела генотипова добијена на основу РСА анализе одговара расподели генотипова у групе на основу боје семењаче.

У трећем делу су приказани резултати експеримената спроведених на ћелијским линијама у којима су испитивана антиоксидативна и антитуморска својства водених екстраката семењача грашка. Екстракти осам од девет испитиваних генотипова, у којима су концентрације најзаступљенијих фенолних компоненти биле испод 1 μ M, су испољавали протективни ефекат на ћелије хумног тератокарцинома NT2-D1 умањујући стварање унутарћелијских реактивних врста кисеоника које је било изазвано егзогеном применом водоник преоксида.

Екстракти семењача генотипова: Aslaug, Assas, Dora, Poneka, Golf, MBK 168 i MBK 173 су показивали цитотоксичне ефекте зависне од концентрације на свим испитиваним ћелијским линијама (хумног карцинома дојке MDA-MB-453, аденокарцинома колона LS174, хроничне мијелоидне леукемије K562 и карцинома плућа A549). Иако није примећена значајна селективност у антитуморском дејству, од значаја је да се истакне да су екстракти показали слабији интензитет према нормалној MRC-5 ћелијској линији. Значајно смањење процента ћелија subG1 фази ћелијског циклуса је примећено за све поменуте екстракте. Експерименти у којима су LS174 ћелије третиране инхибитором каспазе-3, пре третмана поменути екстрактима, су показали да водени екстракти семењаче грашка могу покренути и неки други пут активације ћелијске смрти различит од оног апоптотског посредованог каспазама.

У четвртој сегменту су представљени резултати одређивања способности инхибиције ангиотензин конвертујућег ензима (ACE) *in vitro*. Поменути резултати су указали на знатно израженију способност инхибиције ACE од стране екстракта тамно обојеног генотипа MBK 168 у поређењу са светло обојеним генотипом MBK 90. Поред тога добијене IC₅₀ концентрације је врло тешко постићи у циркулацији, те је стога закључено да је потенцијал примене фенолних једињења грашка као терапеутских агенаса за лечење хипертензије путем инхибиције ACE веома мали. Резултати експеримената дати су у форми слика, и табела са објашњењима у легендама.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су у оквиру посебних целина коментарисани и

упоређивани са оним што су објавили други аутори. Текст у овом поглављу показује добро разумевање проблематике у овој области и способност кандидата да објективно оцени своја и туђа достигнућа.

У поглављу **Закључци** кандидат јасно и детаљно износи низ закључака проистеклих из добијених резултата. Може се рећи да је Н. Станисављевић у својој дисертацији извршио постављене циљеве. Он је успешно испитао утицај термичког третмана и *in vitro* дигестије на принос фенолних једињења и њихове антиоксидативне активности. Успешно је успостављен протокол за екстракцију фенолних једињења из семењача грашка који даје високе приносе. Кандидат је спровео до сада најсвеобухватнију анализу састава фенолних једињења семењача европских генотипова грашка и њихових биолошких активности. Као резултат ове анализе први пут је детектовано девет фенолних једињења чије присуство није било претходно забележено у семенима грашка. Важно је истаћи да је по први пут доказано да водени екстракти семењача грашка испољавају протективни ефекат на ћелије NT2-D1 умањујући стварање унутарћелијских реактивних врста кисеоника које је било изазвано егзогеном применом водоник прексида. Поред тога учињен је и први помак у испитивању механизма цитотоксичности екстракта семена махунарки који испољавају на линијама малигнућ ћелија, о чему до сада није било познатих података.

У поглављу **Литература** приказан је списак од 164 цитиране библиографске јединице. Коришћени су релевантни и обимни литературни наводи, што указује на студиозан приступ аутора анализи резултата ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Stanisavljević, N., Jovanović, Ž., Čupić, T., Lukić, J., Miljuš-Đukić, J., Radović, S., Mikić, A. (2013):** Extractability of antioxidants from legume seed flour after cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion in comparison with methanolic extraction of the unprocessed flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 48:2096-2104. **M22**
2. **Stanisavljević, N., Ilić, M., Jovanović, Ž., Čupić, T., Dabić, D., Natić, M., Tešić, Ž., Radović, S. (2015)** Identification of seed coat phenolic compounds from differently colored pea varieties and characterization of their antioxidant activity. *Archives of Biological Sciences* doi:10.2298/ABS141204042S **M23**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Nemanja Stanisavljević, Živko Jovanović, Tihomir Čupić, Jovanka Lukić, Jovanka Miljuš-Đukić, Svetlana Radović, Aleksandar Mikić, Vesna Maksimović (2012):** An impact of different processing methods on phenolic content and antioxidant activity of legume seed flour extracts. Belgrade Food International Conference: Food, health and well being, Belgrade, 26-28. November 2012. Book of abstracts, p. 57. **M34**
2. **Nemanja Stanisavljević, Živko Jovanović, Tihomir Čupić, Jovanka Lukić, Jovanka Miljuš-Đukić, Svetlana Radović, Aleksandar Mikić, Vesna Maksimović (2013)** Analysis of some nutritional and antinutritional compounds in dry seeds of grass pea and field pea cultivars from Croatia. First Legume Society Conference 2013: A Legume Odyssey, 9-11 May 2013, Novi Sad, Serbia. Book of abstracts, p. 104. **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

На основу увида у докторску дисертацију кандидата **Немање С. Станисављевића**, под насловом „**Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)**”, као и на основу увида у његов рад током реализације ове докторске дисертације, Комисија закључује да дисертација Немање Станисављевића представља оригиналан научни рад, да су постављени задаци успешно остварени и да постигнути резултати пружају вредне податке о саставу фенолних једињења грашка, једне од значајних пољопривредних култура, као и о могућностима примене ових биолошки активних једињења. Немања Станисављевић се показао као вредан и способан научни радник, који не само да има добру теоријску основу и влада методама које се користе у савременим лабораторијама, него уме и да те своје вештине примени у пракси, што је од посебног значаја с обзиром на институцију у којој је запослен. У изради дисертације кандидат је добро поставио циљеве, применио одговарајуће, савремене и разноврсне методе у истраживањима и обради добијених резултата које је критички дискутово, уз исцрпне податке из литературе. Дисертација је написана добро и јасно.

На основу свега изложеног, задовољство нам је да предложимо Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату **Немањи С. Станисављевићу** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Карактеризација и *in vitro* биолошке активности фенолних једињења грашка (*Pisum sativum* L.)**”.

КОМИСИЈА:

др Светлана Радовић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Живко Јовановић, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за
молекуларну генетику и генетичко инжењерство

др Маја Натић, доцент, Универзитет у
Београду – Хемијски факултет

др Ивана Матић, научни сарадник, Институт за
онкологију и радиологију Србије

У Београду, 24. Јул 2015. године