

OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Mr Alma Kurtiš
Fakultet	Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore
Studijski program	Biologija
Broj indeksa	4/19
Podaci o magistarskom radu	Master studije, smjer Biologija II ciklus - Mikrobiologija upisala je 2018. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Sarajevu. Master tezu pod nazivom: „Antimikrobna rezistencija sojeva <i>Escherichia coli</i> iz kliničkih i ambulantnih uzoraka urina” odbranila je 10.12.2019. godine sa srednjom ocjenom (9,00) i stekla zvanje Msc Biologije-Mikrobiologija.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Biološki potencijal i fitohemijska karakterizacija ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Pinus</i> L. (Pinaceae) sa područja Crne Gore
Na engleskom jeziku	Biological potential and phytochemical characterization of extracts of the species genus <i>Pinus</i> L. (Pinaceae) from Montenegro
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	
Naučna oblast doktorske disertacije	Mikrobiologija, bioaktivne materije
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Prirodno-matematički fakultet, Podgorica	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
Dana 31. 08. 2021. godine u 10:00 h, doktorantkinja Alma Kurtiš pristupila je odbrani polaznih istraživanja sprovedenih u okviru izrade doktorske disertacije pod nazivom „Biološki potencijal i fitohemijska karakterizacija ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Pinus</i> L. (Pinaceae) sa područja Crne Gore“, pred komisijom u sastavu:	

1. dr. Jelena Antić Stanković, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. dr. Slađana Krivokapić, vanredni profesor, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore
3. dr. Svetlana Perović, redovni profesor, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore

Kandidatkinja je navela motive odabira teme disertacije, dala pregled naučnih istraživanja u oblasti bioaktivnih materija i mikrobiologije. Detaljno je obrazložila plan istraživanja, metode koje će koristiti i njihove principe rada. Precizno su navedeni pravci i ciljevi istraživanja, hipoteze, kao i očekivani naučni doprinos.

Nakon izlaganja kandidatkinje, članovi komisije su iznijeli svoje komentare, sugestije i postavili pitanja. Uzimajući u obzir kvalitet do sada sprovedenih istraživanja i odbrane, jednoglasno je donijeta odluka da je kandidatkinja uspješno odbranila polazna istraživanja.

B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

B1. Obrazloženje teme

Upotreba ljekovitih biljaka u prevenciji i liječenju različitih oboljenja stara je koliko i samo čovječanstvo. Kako biljke mogu proizvoditi stotine ili čak i hiljade metabolita, koji predstavljaju izvor biološki aktivnih supstanci i lijekova, postoji veliko naučno interesovanje za njihovu fitohemijsku karakterizaciju i ispitivanje biološkog potencijala, odnosno antioksidativne, antimikrobne, antiinflamatorne, antimutagene i antikancerogene aktivnosti. Biološki aktivne materije iz biljnog materijala dobijaju se na različite načine. Najjednostavnije su ekstrakcije iz cijele ili pojedinih dijelova biljke (Kovačević, 2000).

Osnovni izvori bioaktivnosti kod biljaka su uglavnom polifenoli (fenolne kiseline, flavonoidi, antocijani, lignani i stilbeni) i karotenoidi. Flavonoidi predstavljaju najveću grupu biljnih polifenola. U prirodi se javljaju kao slobodni ili u obliku heterozida (Kovačević, 2000). Imaju veliki fiziološki i morfološki značaj za biljke. Poznato je da flavonoidi, poput kasticina, pokazuju antitumorsku aktivnost, centaureidin je citotoksično jedinjenje, dok apigenin i luteolin imaju značajnu estrogenu i antispazmatsku aktivnost (Tuberoso et al., 2009).

Generalno, polifenoli i karotenoidi ostvaruju protektivan efekat jer imaju antioksidantnu aktivnost, djeluju stimulativno na imuni sistem, regulišu ekspresiju gena u procesima ćelijske proliferacije i apoptoze, utiču na metabolizam hormona, djeluju antiviralno, antibakterijski i dr. (Dillard i German, 2000).

Upravo zbog toga se potencijali bioloških resursa danas intenzivno istražuju za dobrobit

čovječanstva, te za poboljšanje kvaliteta života ljudi na održiv način.

Crna Gora posjeduje 1,2 % ukupne svjetske flore što je svrstava u vodeće regije u Evropi po broju biljnih vrsta na jedinici površine. Dakle, postoji znatan prirodni potencijal koji treba naučno istražiti u cilju procjene kvaliteta produkcije prirodnih supstanci, njihove biološke aktivnosti sve u cilju njihove primjene i valorizacije u biljnom inženjeringu i farmaceutskoj i poljoprivrednoj industriji.

Istraživanja biološke aktivnosti četinarara, a naročito vrsta u okviru roda *Pinus* u Crnoj Gori su prilično oskudna. Rod *Pinus* (Fam. *Pinaceae*), sa preko 100 poznatih vrsta, najveći je recentni rod četinarara (Price et al., 1998; Farjon, 2001).

Glavni cilj u okviru ove doktorske disertacije jeste ispitivanje biološkog potencijala (antimikrobnog, antioksidativnog, citotoksičnog na kancer ćelijskim linijama i uticaja na ćelijski ciklus) i fitohemijska karakterizacija ekstrakata odabranih vrsta bora sa područja Crne Gore: *Pinus nigra* (crni bor), *Pinus heldreichii* (munika) i *Pinus halepensis* (alepski bor), *Pinus pinea* (pinjol) i *Pinus sylvestris* (bijeli bor).

B2. Cilj i hipoteze

Glavni cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje biološkog potencijala i fitohemijska karakterizacija ekstrakata iglica odabranih vrsta bora sa područja Crne Gore: *Pinus nigra* (crni bor), *Pinus heldreichii* (munika), *Pinus halepensis* (alepski bor), *Pinus sylvestris* (bijeli bor) i *Pinus pinea* (pinjol).

Podciljevi istraživanja su:

- ispitivanje antimikrobnog potencijala ekstrakata iglica odabranih vrsta bora
- ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata iglica odabranih vrsta bora
- ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakata iglica odabranih vrsta bora na humane kancer ćelijske linije HeLa, LS-174T, A549, FeNx, K562 i MRC-5.
- ispitivanje uticaja ekstrakata iglica odabranih vrsta bora na ćelijski ciklus
- hemijsko identifikovanje aktivnih supstanci iz ekstrakata iglica odabranih vrsta bora
- determinacija hemijskog profila fenola i flavonoida iz ekstrakata iglica odabranih vrsta bora
- komparativna analiza dobijenih rezultata sa podacima iz dostupnih literaturnih izvora

Osnovne hipoteze su:

H1: Sadržaj biološko aktivnih supstanci u ekstraktima iglica odabranih vrsta bora uticaće na njihov biološki potencijal: antioksidativni, antimikrobni i citotoksični.

H2: Različiti postupci pri dobijanju ekstrakata iglica odabranih vrsta bora uticaće na kvalitet ekstrakata, a samim tim i na determinaciju njihovog biološkog potencijala

H3: Ekstrakti iglica odabranih vrsta bora pokazaće različiti fitohemijski profil i biološke potencijale u zavisnosti od vrste.

B3. Metode i plan istraživanja

Terenska istraživanja, prikupljanje materijala i skladištenje podataka:

Terenska istraživanja i prikupljanje biljnog materijala odabranih vrsta roda *Pinus*, započeta su u januaru 2021. godine. Biljke su sakupljene sa sljedećih lokaliteta : Kosanica-Đurđevića Tara (Pljevlja), Virpazar (Podgorica), Orjen sedlo (Herceg Novi), Mirišta, Luštica (Tivat).

Obrada prikupljenih uzoraka:

Prikupljeni materijal različitih vrsta bora (*Pinus sylvestris*, *P. heldreichii*, *P. halepensis*, *P. nigra* i *P. pinea*) će biti predat na uvid, identifikaciju i potvrdu od strane stručnog lica. Nomenklatura i klasifikacija će biti usaglašena sa listom Euro+Med (2006).

Ekstrakcija biljnog materijala

Najvažniju grupu biljnih preparata predstavljaju ekstrakti, koji se dobijaju primjenom različitih metoda ekstrakcije, počev od jednostavnih tehnologija do naprednih tehnika. Generalno, tradicionalne ekstrakcije (maceracija, digestija i Sokslet ekstrakcija) se sve više zamjenjuju savremenim, kao što je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Ispitivanjem uticaja ultrazvuka na ekstrakciju bioaktivnih materija iz biljnog materijala, pokazan je pozitivan efekat koji se pripisuje kavitacionim događajima koji utiču na razaranje ćelijskog zida, hidrataciju biljnog materijala, smanjenje veličine biljnih čestica i ubrzanje prenosa mase ekstraktivnih supstanci (Vinatoru et al., 1997; Toma et al., 2001). Pozitivan uticaj ultrazvuka dokazan je kod ekstrakcije farmakološki aktivnih materija (Paniwnyk et al., 2001; Sališová et al., 1997; Valachovič et al., 2001) i polisaharida (Hromádková et al., 1999) iz mnogih biljaka. U okviru ovog istraživanja

ekstrakti dobijeni konvencionalnom maceracijom, ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i digestijom, biće podvrgnuti potrebnim hemijskim analizama kako bi se ispitao biološki potencijal odabranih vrsta bora.

Određivanje antimikrobnog potencijala biljnih ekstrakata

Za procjenu antimikrobnog potencijala ekstrakata iglica bora koristiće se standardna mikrodiluciona metoda. Za određivanje vijabilnosti ćelija koristiće se oksidoredukciona boja rezasurin. Za ispitivanje antimikrobnog potencijala koristiće se Gram pozitivne i Gram negativne bakterije iz ATCC kolekcije i klinički sojevi izolovani iz humanog materijala.

Određivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata

Procjena antioksidativne aktivnosti ekstrakata iglica bora biće upoređena sa antioksidativnom aktivnošću komercijalnih sintetskih antioksidanata: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BTH), propil-galat (PG) i (1,1-dimetiletil)-4-metoksifenol (BHA).

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih ekstrakata biće određen mjerenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH radikale (DPPH test). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot-centriranog DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u redukovanu, žuto obojanu formu DPPH-H. Za spektrofotometrijska mjerenja biće korišćen UV/VIS spektrofotometar CECIL CE 7200.

Određivanje citotoksičnog efekta biljnih ekstrakata na kancer ćelijskim linijama

Ćelijske suspenzije pripremaju se u kompletnom hranljivom medijumu sa 10% FBS-om. HeLa (2000 ćelija/100 µl po bunaru), LS-174T (7000 ćelija/100 µl po bunaru), A549 (5000 ćelija/100 µl po bunaru), FeNx (5000 ćelija/100 µl po bunaru), EA.hy926 (5000 ćelija/100 µl po bunaru) i MRC-5 (5000 ćelija/100 µl po bunaru) se zasijavaju u mikrotitarske ploče, nakon inkubacije od 24 h, tokom koje dolazi do adhezije ćelija, ćelije se tretiraju sa po 50 µl rastvora ispitivanih ekstrakata u pet različitih koncentracija. Pet različitih koncentracija uzoraka (12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml i 200 µg/ml) pripremaju se u hranljivom medijumu sa 10% FBS-om iz štokova rastvora koncentracije 50 mg/ml u dimetil sulfoksidu (DMSO).

Inkubacija HeLa, LS-174T, A549, FeNx, K562 i MRC-5 ćelija traje 72 h, dok EA.hy926 ćelije inkubiraju se 24 h i 48 h. Vijabilnost ćelija ispituje se MTT testom.

Određivanje uticaja biljnih ekstrakata na ćelijski ciklus

Za ispitivanje uticaja ekstrakata iglica bora na ćelijski ciklus koristi će se HeLa ćelije (200 000 ćelija/2 ml po bunaru) zasijane u hranljivom medijumu (RPMI 1640) sa 10% FBS-om u pločama sa 6 bunara. Nakon 24 h medijum se uklanja i ćelije se tretiraju rastvorima vodenog i etanolnog ekstrakta u koncentracijama IC50 i 2IC50. U kontrolni uzorak dodaje se samo medijum. Nakon inkubacije od 24 i 48 h kontrolni i tretirani uzorci HeLa ćelija se sakupljaju nakon tripsinizacije (Trypsin 0.25%), isprani PBS-om i prebačeni u epruvete za citometar. Uzorci se analiziraju na FACSCalibur protočnu citometriju (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države). Detektuje se po 10 000 događaja u svakom uzorku. Na osnovu dobijenih DNK histograma (broj događaja u odnosu na FL2-A (engl. FL2-area)) određuje se procenat ciljnih HeLa ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Podaci se analiziraju uz pomoć CELLQuest softvera (BD Biosciences, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države).

U toku istraživanja planiran je boravak doktoranta, na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. U laboratoriji za mikrobiologiju i imunologiju planirano je da se ispita citotoksični efekat ekstrakata iglica bora na kancer ćelijskim kulturama i uticaj ekstrakata iglica bora na ćelijski ciklus i apoptozu.

Određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Ukupan fenolni sadržaj biljnog ekstrakta mjeri se spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteu. Ukratko, 20 µL biljnog ekstrakta miješa se s 0,2 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 2 ml dejonizirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Smješa se inkubira 30 minuta na temperaturi od 50 ° C u vodenom kupatilu (VIMS elektrik, Srbija), a zatim se mjeri apsorbanacija na talasnoj dužini od 765 nm. Rezultati ukupnog sadržaja fenola (TPC) izražavaju se u miligramima ekvivalenata galne kiseline (GAE) / g suvog uzorka na osnovu standardne krive galne kiseline ($Y = 0,0057 x + 0,1203$, $R^2 = 0,9913$). Mjerenja se ponavljaju tri puta.

B4. Naučni doprinos

Hemijska i biološka aktivnost vrsta roda *Pinus* u Crnoj Gori je jako malo poznata. Stoga, istraživanja biljnih ekstrakata odabranih vrsta bora mogu pospiješiti pronalaženje novih i

efikasnijih biološki aktivnih agenasa koji mogu naći primjenu u različitim aspektima farmaceutске i poljoprivredne industrije.

Prije svega saznanja o antioksidativnoj aktivnosti biljnih ekstrakata mogu doprinijeti u prevenciji i terapiji bolesti nastalih usled oksidativnog stresa. Takođe, saznanja o antimikrobnom potencijalu biljnih ekstrakata mogu dati doprinos u borbi protiv mnogih patogenih mikroorganizama, kao i antibiotski rezistentnih vrsta, imajući u vidu da se mikrobna rezistencija na biljne metabolite teže stiče zbog njihovog kompleksnog sadržaja u odnosu na antibiotike. Citotoksični efekat biljnih ekstrakata na kancer ćelijske kulture produbiće saznanja o mogućoj iskoristljivosti prirodnih resursa u prevenciji i tretmanu kancera.

B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja

Istraživanje je pokriveno stipendijom Ministarstva nauke i dodjeljuje se u ukupnom bruto iznosu od 51.662,00 € za period od 34 mjeseci, odnosno od 03. januara 2020. godine do 31. oktobra 2022. godine.

Mišljenje i prijedlog komisije

Komisija je za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidatkinje, nakon detaljnog razmatranja prijavljene teme i javne prezentacije polaznih istraživanja, kao i datih odgovora na postavljena pitanja, došla do zaključka da su polazna istraživanja kandidatkinje Alme Kurtiš. originalno naučno istraživanje koje predstavlja važan doprinos u oblasti bioaktivnih materija i mikrobiologije.

Metode i ciljevi istraživanja detaljno su i precizno definisani i smatraju se primjenljivim za dato istraživanje. Predložena tema je multidisciplinarna, što doprinosi njenom kvalitetu i značaju. Uzimajući u obzir sve prethodno navedeno, Komisija je saglasna da je tema istraživanja aktuelna kao i da odgovara nivou i ozbiljnosti istraživanja za doktorsku disertaciju. Stoga, komisija predlaže Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta da podrži prijavu doktorske disertacije Alme Kuriš.

Prijedlog izmjene naslova

(po potrebi predložiti izmjenu naslova)

Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora

(titula, ime i prezime, ustanova)

Planirana odbrana doktorske disertacije

2022., zimski semestar

Izdvojeno mišljenje

(popuniti ukoliko neki član komisije ima izdvojeno mišljenje)



ObrazacD1: Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

		Ime i prezime	
Napomena			
(popuniti po potrebi)			
ZAKLJUČAK			
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.			DA NE
Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.			DA NE
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze.			DA NE
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata			
Dr Jelena Antić Stanković, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija		(Potpis)	
Dr Slađana Krivokapić, vanredni profesor, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore		(Potpis)	
Dr Svetlana Perović, redovni profesor, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore		(Potpis)	
U Podgorici, 10.09.2021.		DEKAN	