

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

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.09.2019. године, на основу молбе ментора, др Срећка Ђурчића, редовног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета и др Ане Ђирић, вишег научног сарадника Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Марије З. Ненадић, под насловом: „Антимикробни и антитуморски потенцијал секрета и морфолошка карактеризација жлезданих структура пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака (Coleoptera: Carabidae)“, у саставу:

1. Др Срећко Ђурчић, редовни професор Универзитета у Београду - Биолошког факултета;
2. Др Ана Ђирић, виши научни сарадник Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“;
3. Др Марина Соковић, научни саветник Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“;
4. Др Дејан Пантелић, научни саветник Универзитета у Београду - Института за физику;
5. Др Ивица Димкић, научни сарадник Универзитета у Београду - Биолошког факултета.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Марије З. Ненадић написана је на 187 страна и садржи 39 графичких прилога (комплета слика). Текст ове докторске дисертације је груписан у 8

поглавља: Увод (49 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (20 страна), Резултати (40 страна), Дискусија (27 страна), Закључци (4 стране), Прилози (5 страна) и Литература (29 страна). Поред текста који припада наведеним поглављима, дисертација садржи и насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима Комисије, захвалницу, резиме на српском и енглеском језику, садржај, листу скраћеница стручних појмова, списак интернет адреса коришћених у раду, биографију кандидаткиње, списак објављених и саопштених радова проистеклих из докторске дисертације, као и Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

Експериментални део ове докторске дисертације је урађен на Катедри за зоологију бескичмењака и ентомологију Института за зоологију Универзитета у Београду - Биолошког факултета, у Миколошкој лабораторији Одељења за физиологију биљака Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, у Центру за фотонику Универзитета у Београду - Института за физику, на Катедри за алгологију, микологију и лихенологију Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“ Универзитета у Београду - Биолошког факултета, на Катедри за микробиологију Института за ботанику и ботаничке баште „Јевремовац“ Универзитета у Београду - Биолошког факултета, у Лабораторији за инструменталну анализу на Катедри за органску хемију Универзитета у Београду - Хемијског факултета, као и у сарадњи са лабораторијом Политехничког института, Кампус Санта Аполонија, Mountain Research Centre (СМО) Пољопривредног факултета, Браганса, Португал.

Анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод**, дати су подаци о основним карактеристикама породице Carabidae, са посебним освртом на морфологију и анатомију њиховог пигидијалног жлезданог комплекса, као и на хемијски састав њихових секрета и биосинтезу једињења. Такође, дат је преглед биолошких активности различитих продуката инсеката, при чему је стављен акценат на антибактеријско, антифунгално, цитотоксично и антитуморско дејство органских једињења која се налазе у саставу секрета пигидијалних жлезда испитиваних врста трчуљака. Посебан део Увода се односи на еколошке принципе и односе трчуљака и микроорганизама из пећинских станишта, при чему су представљени системи одбране

ових инсеката од патогених микроорганизама из околног станишта до сада познати у доступној литератури. Овај део Увода представља еколошку позадину претходно представљеног и истакнутог антимикубног потенцијала излучевина Coleoptera.

У последњем делу Увода појашњени су употреба и значај скенирајуће електронске микроскопије и нелинеарне микроскопије у морфо-анатомским студијама, са посебним освртом на испитивања у карабидологији.

На основу претходно публикованих референци, утврђено је да одређени анални и орални секретни тврдокрилаца поседују антимикубно дејство, као и да једињења која се налазе у саставу секрета пигидијалних жлезда одређених врста трчуљака поседују антимикубни, цитотоксични и антитуморски потенцијал, што упућује на значај ових једињења у тренутним и будућим биомедицинским и фармаколошким истраживањима.

У оквиру поглавља **Циљеви рада**, истакнути су задаци, као и специфична питања на која би студије у оквиру ове дисертације требало да пруже одговоре и додатна појашњења. Основни циљеви ове дисертације били су испитивање и утврђивање антимикубног и антитуморског дејства секрета пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака (Coleoptera: Carabidae), као и морфо-анатомска анализа и карактеризација пигидијалног жлезданог комплекса одабраних таксона употребом скенирајуће електронске микроскопије и нелинеарне микроскопије.

Као један од циљева, планирана је *in vitro* антимикубна студија, при чему је применом методе микродилуције испитано дејство секрета пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака на хумане патогене (бактерије и микромицете), који представљају узрочнике разних обољења код људи. Такође, планирани циљ је био и испитивање цитотоксичног дејства и антитуморског потенцијала секрета пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака применом сулфородамин Б есеја.

Један од задатака је био да се испита и еколошка позадина антимикубних својстава тестираних секрета, посебно дејство секрета троглофилних трчуљака на потенцијалне патогене из околног пећинског станишта. Поред наведеног, била је предвиђена и морфо-анатомска анализа и карактеризација пигидијалних жлезданих структура одабраних таксона трчуљака применом скенирајуће електронске микроскопије и нелинеарне микроскопије, а у циљу детаљнијег увида у форму, распоред и дијаметар морфолошких микроструктура, што би допринело детаљнијем познавању морфо-

анатомског аспекта ових жлезда, као и њихове функције, што до сада није било елаборирано у доступним литературним подацима.

Један од основних циљева је било и успостављање корелације између антимикуробног и цитотоксичног дејства испитиваних секрета, као и проналажење објашњења за постојање ових биолошких активности.

Главни циљ ове дисертације је био да се укаже на могућност употребе инсекатских продуката, као и синтетичких аналога једињења која се налазе у саставу поменутих излучевина у фармаколошким и биомедицинским истраживањима, што може имати терапеутски значај у будућности.

У поглављу **Материјал и методе**, наведени су сви анализирани таксони трчуљака, њихове основне карактеристике и локалитети на којима су сакупљене адултне јединке. Студирани су следећи таксони трчуљака: *Abax (Abax) parallelepipedus* (Piller & Mitterpacher, 1783), *Calosoma (Calosoma) sycophanta* (Linnaeus, 1758), *Carabus (Chaetocarabus) intricatus* Linnaeus, 1761, *Carabus (Eucarabus) ullrichii* Germar, 1824, *Carabus (Procrustes) coriaceus* Linnaeus, 1758, *Carabus (Tomocarabus) convexus* Fabricius, 1775, као и *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828).

Укратко је објашњен поступак сакупљања, конзервирања и складиштења јединки инсеката, као и изоловање и конзервација продуката пигидијалних жлезда и њихова припрема за даље анализе. Дати су детаљан приказ припреме култура бактерија и микромицета (лабораторијских и клиничких сојева), као и приказ прикупљања узорака и изолације сојева бактерија и микромицета из пећинских станишта. Такође, приказани су и припрема еукариотских нетуморских и туморских ћелијских култура, као и хистолошка припрема ткива за микроскопију. Примењене су анализе микродилуционом методом, сулфородамин Б есејем, скенирајућом електронском микроскопијом и нелинеарном микроскопијом.

Поглавље **Резултати** састоји се од четири потпоглавља. У оквиру првог потпоглавља, анализиран је антимикуробни потенцијал (антибактеријска и антифунгална активност) секрета пигидијалних жлезда одабраних таксона из породице Carabidae на хумане патогене. Овде се истиче висок степен антибактеријског дејства секрета пигидијалних жлезда врсте *L. (P.) punctatus* у односу на секрете осталих анализираних врста трчуљака, при чему су бактеријски сојеви *Micrococcus flavus* и *Escherichia coli*

показали нешто већу резистентност у односу на остале тестиране патогене. Секрет *L. (P.) punctatus* је постигао највећи степен антифунгалне активности, што се огледа у 5 пута мањим вредностима минималних инхибиторних и минималних фунгицидних концентрација у односу на синтетички антимиотик бифоназол. У случају тестирања појединих микромицета (*Aspergillus ochraceus* и *Trichoderma viride*), овај секрет је показао приближно 20-50 пута јачи ефекат у односу на комерцијални антимиотик кетоконазол, док је након третирања микромицете *Penicillium ochrochloron* овим секретом забележен око 150 пута већи антифунгални потенцијал у односу на горепоменућу позитивну контролу. При тестирању антимиотног дејства секрета *L. (P.) punctatus* на сојевае бактерија и микромицета изоловане из гуана и са зидова из пећинског станишта (Огореличке пећине), установљен је такође значајан антимиотни потенцијал. Грампозитивни изолати су генерално показали већу осетљивост у поређењу са Грамнегативним изолатима. *Enterococcus eurekaensis* се показао као најсензибилнији бактеријски сој, поред истовремено остварене резистентности у односу на антибиотик стрептомицин при највећој тестираној концентрацији. *Escherichia fergusonii* је показала готово дупло већу осетљивост према тестираном секрету у поређењу са поменућим антибиотиком. Када су у питању сојеви микромицета, установљен је сличан степен сензибилитета свих тестираних изолата у односу на секрет *L. (P.) punctatus*, при чему су *Penicillium citrinum* и *Trichoderma harzianum* били осетљивији према овом секрету у односу на позитивну контролу нистатин.

Након антимиотног есеја, испитан је и цитотоксични ефекат секрета пигидијалних жлезда одабраних таксона трчуљака у циљу додатне потврде њиховог антимиотног потенцијала. Утврђено је да су тестирани секретни достигли низак проценат инхибиције пролиферације примарних ћелија хепатоцита (PLP2), међутим, GI₅₀ вредност није постигнута ни при тестирању хуманих туморских ћелија. Изузетак представља секрет врсте *L. (P.) punctatus*, који је при највећој тестираној концентрацији досегао приближно 50% инхибиције ћелијске пролиферације, и то у случају MCF-7 ћелијске културе (аденокарцином дојке). Позитивна контрола елиптицин се генерално показала као ефикаснија у односу на испитиване секрете, мада је цитотоксични ефекат овог антиканцерогеног лека на PLP2 био већи у односу на тестиране секрете.

Када је у питању морфо-анатомски аспект ове дисертације, утврђено је да примена скенирајуће електронске микроскопије и нелинеарне микроскопије пружа детаљнији увид у спољашњу и унутрашњу морфологију пигидијалних жлезданих структура одабраних таксона трчуљака у односу на конвенционалну светлосну микроскопију. Тродимензионалне информације, прецизнији увид у распоред и дијаметар микроструктура (нпр. снопова мишићних влакана зида резервоара, најситнијих сабирних канала секреторних лобуса, спиралних задебљања на унутрашњим зидовима сабирних канала), као и увид у прецизан дијаметар крупнијих структура (секреторних лобуса, главног сабирног и еферентног канала и резервоара) су допринели упознавању структурираности овог жлезданог комплекса. Установљен је најпогоднији протокол припреме ових жлезда за примену скенирајуће електронске микроскопије, што је подразумевало дехидратацију узорака на сваких 10 минута у 30%, 50%, 70%, 90% и 2 пута у 100% етил-алкохолу. Овим поступком је избегнута примена методе критичне тачке сушења (critical point drying, енгл.), која у великој мери оштећује ткиво пигидијалних жлезда. Уочена је претпостављена сличност у морфологији пигидијалних жлезда посматраних врста рода *Carabus* Linnaeus, 1758 [*C. (E.) ullrichii*, *C. (P.) coriaceus* и *C. (T.) convexus*], код којих се уочава форма резервоара типична за све представнике потпородице Carabinae. Такође, на попречном пресеку секреторних лобуса врсте *L. (P.) punctatus* је уочено да ове структуре могу имати, поред сферичне и бубрежасте, и елипсоидну форму, што није до сада забележено конвенционалном светлосном микроскопијом. Димензије резервоара могу варирати између јединки исте врсте, а величина ових структура пропорционално прати величину тела. Установљено је да је читав жлездани систем у вези са системом многобројних трахеола варијабилног дијаметра, што упућује на добру аерисаност ткива.

У поглављу **Дискусија** су анализирани и разматрани постигнути резултати, уз њихово поређење са претходно публикованим подацима у доступној литератури. Указано је на сва значајна сазнања која су по први пут публикована у овој докторској дисертацији, са критичким освртом на резултате других истраживања у овој области. Посебан акценат је стављен на установљен значајан степен антимикробног потенцијала секрета пигидијалних жлезда одабраних таксона из породице Carabidae, превасходно на секрете који су досегли неколико десетина пута јачи антифунгални потенцијал у односу на комерцијалне антимикотике. Даље је образложена потенцијална еколошка позадина

постојања ових биолошких активности, које су остварене при тестирању хуманих патогена. Успостављена је корелација између антимикубног и цитотоксичног дејства испитиваних секрета, а резултати цитотоксичног есеја упућују на веома низак степен цитотоксичне активности у односу на позитивну контролу, осим када је у питању секрет врсте *L. (P.) punctatus*, који је остварио приближно 50% инхибиције ћелијске пролиферације MCF-7 туморске ћелијске културе. Наведени резултати упућују на могућност даљих истраживања на овом плану. Уочене биолошке активности секрета се могу појаснити уделом одређених органских конституената присутних у смеси секрета пигидијалних жлезда, а за које је претходно установљен антимикубни, односно антитуморски потенцијал (нпр. бутирична, изобутирична, сирћетна, мравља, палмитинска и олеинска киселина, салицилалдехид и сл.). За даље разматрање остаје да се утврди да ли су одређени конституенти секрета одговорни за овај ефекат или одговор лежи у синергистичком дејству већег броја органских једињења унутар секрета. Што се тиче морфо-анатомске грађе пигидијалних жлезда, установљен је детаљнији увид у распоред и дијаметар микроструктура, добијени су прецизнији подаци о промеру крупнијих структура, а уочена је и нешто другачија форма одређених структура (секреторних лобуса и резервоара) у односу на доступне публиковане податке.

Ова дисертација отвара могућности за даља истраживања у областима биомедицине и фармакологије, што може бити значајно у будућности са терапеутског аспекта, али и могућности ка детаљнијим студијама везаним за морфологију, анатомију, физиологију и функционисање пигидијалног жлезданог комплекса.

У **Закључцима** је у сажетој форми дато сумирање најважнијих информација наведених у поглављима Резултати и Дискусија, чиме је истакнут научни значај докторске дисертације кандидаткиње.

У оквиру поглавља **Прилози**, налази се укупно 5 слика, графикана и табеларних приказа.

У поглављу **Литература**, наводи се листа од 254 библиографске јединице. Наведене референце се односе на области истраживања од значаја за докторску дисертацију, тако да доприносе објашњењу добијених резултата. Кандидаткиња је навела најважније изворе података релевантне за тему докторске дисертације, а посебно је значајно то што је укључила велики број нових литературних извора, публикованих у

последњих пар година, чиме је потврдила да прати савремене научне токове у свету из релевантне научне области.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Nenadić, M.**, Ljaljević-Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Ćirić, A., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijeвић, M., Vesović, N., Živković, N. & Ćurčić, S. (2017) Antifungal activity of the pygidial gland secretion of *Laemostenus punctatus* (Coleoptera: Carabidae) against cave-dwelling micromycetes. *The Science of Nature*, 104 (5-6), 52. (M21) <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1474-4>
2. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Tešević, V., Todosijeвић, M., Vujisić, L., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2017) The pygidial gland secretion of the forest caterpillar hunter, *Calosoma (Calosoma) sycophanta*: the antimicrobial properties against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (3), 977-985. (M21) <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8082-7>
3. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijeвић, M., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2016) Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of three ground beetle species (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *The Science of Nature*, 103 (3-4), 34. (M21) <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1358-z>
4. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijeвић, M., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2016) Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of the troglomorphic ground beetle *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828) (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *Bulletin of Entomological Research*, 106 (4), 474-480. (M21) <https://doi.org/10.1017/S0007485316000109>
5. **Nenadić, M.**, Soković, M., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Ćirić, A., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2018) Inhibition of tumour and non-tumour cell proliferation by pygidial gland secretions of four ground beetle species (Coleoptera: Carabidae). *Biologia*, 73 (8), 787-792. (M23) <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0082-x>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Tešević, V., Vujisić, L., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2019) The pygidial gland secretions of ground beetles (Insecta: Coleoptera: Carabidae): antimicrobial and antitumour activity of the natural products. 2nd Balkans-China Mini-Symposium on Natural Products and Drug Discovery, Belgrade, Serbia, 11-13 April 2019. Book of Abstracts, 43. **(M34)**
2. **Nenadić, M.**, Krmpot, A., Vesović, N., Rabasović, M., Ćurčić, S., Pavlović, D., Lačković, V., Savić-Šević, S. & Pantelić, D. (2018). Assessment of three microscopic techniques in observing morphology of pygidial glands of ground beetles. Electron Microscopy of Nanostructures (ELMINA2018) Conference, Belgrade, Serbia, 27-29 August 2018. Book of Abstracts, 252-254. **(M34)**

Мишљење и предлог Комисије

Комисија сматра да је истраживање у оквиру докторске дисертације кандидаткиње Марије З. Ненадић под насловом „Антимикробни и антитуморски потенцијал секрета и морфолошка карактеризација жлезданих структура пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака (Coleoptera: Carabidae)“ засновано на савременим сазнањима и да је адекватно и прецизно спроведено. Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Добијени резултати су прегледни, јасни, добро критички продискутовани, представљају значајан допринос познавању антимикробног и антитуморског дејства секрета пигидијалних жлезда и морфологије и анатомије пигидијалних жлезданих структура трчуљака (Coleoptera: Carabidae) и указују на значај потенцијалне примене тестираних излучевина и синтетичких аналога једињења у саставу анализираних секрета у будућим биомедицинским и фармаколошким истраживањима. Такође, кандидаткиња је успоставила врло значајну корелацију између антимикробног и цитотоксичног дејства студираних секрета, као и корелацију дејства секрета на микроорганизме хумане патогене и микроорганизме изоловане из пећинских станишта у сврху проналажења и појашњења

еколошке позадине биолошких активности секрета пигидијалних жлезда тестираних таксона трчуљака. Резултати истраживања ове докторске дисертације публиковани су у 5 радова у међународним часописима (4 из категорије М21 и 1 из категорије М23), а саопштени су на 2 међународна научна скупа (2 публикације из категорије М34). На свим публикацијама проистеклим из докторске дисертације, кандидаткиња је први аутор.

На основу свега претходно наведеног, мишљења смо да је Марија З. Ненадић у потпуности испунила задатке које је пред себе поставила пре израде дисертације. Комисија за преглед и оцену докторске дисертације предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета да прихвати овај Извештај.

КОМИСИЈА:

У Београду, 06.09.2019. године

Др Срећко Ђурчић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Др Ана Ђирић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Др Марина Соковић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Др Дејан Пантелић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за физику

Др Ивица Димкић, научни сарадник
Универзитет у Београду - Биолошки факултет