

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ  
ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

## 1. Одлука Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-14219/3-4 од 24.12.2014. године, формирана је комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др Милана Зарића** под називом: „**Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије**“, у следећем саставу:

1. **Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник;
2. **Проф. др Наташа Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан;
3. **Проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;
4. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;
5. **Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан.

## 2. Извештај комисије о подобности теме

### 2.1. Кратка биографија кандидата

Милан (Милосав) Зарић је рођен 27.10.1982. године у Крагујевцу, где је завршио основну школу и Прву крагујевачку гимназију. Медицински факултет у Крагујевцу је уписао школске 2001/02. године, а дипломирао марта 2008. године са просечном оценом 9,40. У току студија више пута је награђиван за постигнут успех. Обавио је обавезни лекарски стаж и положио стручни испит. Докторске академске студије, смер: Клиничка и експериментална интерна медицина, уписао је школске 2008/09. године, а усмени докторантски испит је положио 2011. године. Од 2009. године, др Милан Зарић је био ангажован као сарадник у настави за предмет Биохемија на Катедри за биохемију Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Од 2011. године је ангажован као сарадник у звању асистента за предмет Биохемија на Катедри за биохемију Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Говори енглески и немачки језик, познаје рад на рачунарима.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** "Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије"

**Предмет:** Испитивање цитотоксичности две различите врсте прополиса, хризина и екстракта биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на леукемијским ћелијским линијама (MOLT-4 и JVM-13), као и на лимфоцитима изолованим из крви пацијената оболелих од HLL-а и на мононуклеарним леукоцитима изолованим из периферне крви здравих особа (контрола).

**Хипотеза:** Прополиси, хризин и екстракти биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* делују цитотоксично на леукемијске ћелије, а не делују цитотоксично на мононуклеарне леукоците изоловане из периферне крви здравих особа. Наведене супстанце индукују апоптозу леукемијских лимфоцита повећањем релативног односа Вах/Bcl-2, што индукује транслокацију цитохрома c из митохондрија у цитоплазму и активацију каспазе-3.

## 2.3. Подобност кандидата

Кандидат је објавио један рад у целини у међународном часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. Zaric M, Mitrovic M, Nikolic I, Baskic D, Popovic S, Djurdjevic P, Milosavljevic Z, Zelen I. Chrysin Induces Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes Isolated from Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015; 15(2):189-95 **M22=5 бодова**

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Хронична лимфоцитна леукемија (HLL) је малигно обољење хематопоезног ткива које настаје пролиферацијом и акумулацијом клона имунски некомпетентних В лимфоцита у костној сржи, лимфним жлездама, слезини и другим органима. Код овог обољења постоји прогресивна акумулација леукемијских ћелија која настаје не због убрзане пролиферације, већ због продуженог живота лимфоцита услед инхибиције апоптозе.

Обзиром да поремећај апоптозе није уључен само у процес леукемогенезе, већ је повезан и са резистенцијом оболелих од HLL-а на стандардну терапију, потребно је наћи нове агенсе који би реактивирали апоптозу HLL лимфоцита.

Процес програмиране ћелијске смрти може бити започет спољашњим путем преко рецептора смрти или унутрашњим, митохондријалним сигналним путем када се ослобађа цитохром c из митохондрија. У оба случаја долази до активације ефекторске каспазе-3 и апоптозе. Сматра се да поремећај апоптозе може настати као резултат промењеног односа проапоптотичних и антиапоптотичних протеина. HLL лимфоците карактерише прекомерна експресија антиапоптотичних протеина Bcl-2 фамилије (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1). Прекомерна експресија Bcl-2 протеина, а пре свега повећање експресије Bcl-2 у односу на његов проапоптотични лиганд Вах, утичу на продужено преживљавање HLL лимфоцита.

Различите врсте прополиса садрже флавоноиде који могу да индукују апоптозу малигнућ ћелија. Хризин, флавоноид присутан у прополису, индукује апоптозу појединих леукемијских ћелијских линија. Екстракти појединих биљака (*Ligustrum vulgare*, *Teucrium*

pollium) и гљива (*Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*) такође индукују апоптозу код неких туморских ћелијских линија. Ни за једну од ових супстанци није познато како утиче на вијабилност HLL лимфоцита, нити на који начин делује на протеине који су важни за процес апоптозе HLL лимфоцита.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

### Значај истраживања

Предложена студија ће омогућити:

1. Боље разумевање фактора који утичу на вијабилност леукемијских лимфоцита.
2. Дефинисање механизма деловања одговарајућих биоактивних супстанци.

Планирана истраживања би требало да омогуће боље разумевање ћелијских механизма који су дефектни код малигно измењених лимфоцита. Ипак, најзначајнији одговор био би потенцијално антитуморско дејство неке од испитиваних природних супстанци на леукемијске лимфоците, као и проналажење биоактивне супстанце која би у одређеним концентрацијама и након адекватног временског интервала, смањила вијабилност леукемијских лимфоцита, а истовремено не би утицала на мононуклеарне леукоците изоловане из крви здравих особа. Таква супстанца би могла даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за лечење хроничне лимфоцитне леукемије.

### Циљ истраживања

Примарни циљеви ове студије су:

1. Испитивање потенцијалне цитотоксичности наведених биоактивних супстанци, МТТ тестом и LDH тестом.
2. Утврђивање које од ових биоактивних супстанци делују цитотоксично на леукемијске лимфоците, а не мењају вијабилност здравих лимфоцита, при истим концентрацијама супстанци и за исти временски период. Даља испитивања би укључила само такве супстанце.
3. Одређивање релативног односа некротичне и апоптотске смрти леукемијских лимфоцита изазване испитиваним супстанцама.
4. Утврђивање утицаја испитиваних супстанци на релативни однос проапоптотичног Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина.
5. Одређивање ефекта испитиваних супстанци на локализацију цитохрома c и активацију каспазе-3.

## 2.6. Веза са досадашњим истраживањима

Прополиси, хризин и метанолски екстракти биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* делују цитотоксично на поједине ћелијске линије хуманих туморских ћелија *in vitro*. Ипак, није познато на који начин ове супстанце утичу на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије. Такође, механизам деловања ових супстанци није познат.

## 2.7. Методе истраживања

### Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. За истраживање ће се користити две леукемијске ћелијске линије MOLT-4 и JVM-13, лимфоцити изоловани из узорака крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије који се лече у Клиници за хематологију Клиничког центра „Крагујевац“, док ће се мононуклеарни леукоцити контролне групе здравих испитаника добијати из узорака крви Службе за снабдевање крвљу и крвним продуктима КЦ „Крагујевац“.

### Популација која се истражује

У студију ће бити укључени одрасли испитаници оба пола, који имају потврђену дијагнозу хроничне лимфоцитне леукемије на основу клиничких, лабораторијских и имуно-фенотипских параметара, који се лече у Клиници за хематологију КЦ „Крагујевац“ и који дају пристанак за добровољно учешће у студији. Контролну групу сачињаваће здрави испитаници сличне полне и старосне структуре, који не болују од болести или стања који би могли да утичу на вредност испитиваних параметара.

### Узорковање

Испитаници експерименталне групе ће у студију бити регрутовани из укупне популације болесника оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије који се лече у Клиници за хематологију КЦ „Крагујевац“. Укључивање ће бити спровођено сукцесивно, према принципу случајног избора (без претходно утврђене рандомизације) до постизања довољног броја испитаника сходно прорачуну величине студијског узорка. На основу карактеристика испитаника експерименталне групе, контролна група здравих ће се селектовати након лекарског прегледа, из кохорте здравих добровољних давалаца крви (истог пола и старости  $\pm 2,5$  године, за одговарајућу особу из експерименталне групе). Узорци крви испитаника контролне групе добиће се у Служби за снабдевање крвљу и крвним продуктима КЦ „Крагујевац“. Укључивање здравих испитаника ће се такође спровести према принципу случајног избора до дана када ће бити постигнут укупни број испитаника, а сходно прорачуну величине студијског узорка. Од свих испитаника ће прво бити затражен писани информисани пристанак уз пуну обавештеност. По обезбеђеном пристанку, прикупиће се анамнестички подаци, а након тога испитаницима ће бити узет узорак крви. Из узорака крви испитаника експерименталне, као и испитаника контролне групе прво ће се изоловати мононуклеарни леукоцити по методи Boum-a, а затим ће се издвојити лимфоцити од моноцита по методи Kennedy и Reynolds-a.

### Варијабле истраживања

Независне варијабле студије (узрок) представљаће примењене биоактивне супстанце, а зависне варијабле (исход), представљаће вредности мерених параметара вијабилности и апоптозе лимфоцита.

Од биоактивних супстанци којима ћемо третирати лимфоците у *in vitro* условима користиће се две врсте прополиса различитог географског порекла и састава, хризин, метанолске екстракте појединих биљака (метанолски екстракт листа и плода *Ligustrum vulgare*, метанолски екстракт листа *Teucrium pollium*) и метанолске екстракте гљива

*Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*, код којих је регистрована анти-канцерска активност на хуманим туморским ћелијским линијама.

Коришћени прополиси су различитог географског порекла и имају другачији однос активних супстанци. Добијени су у изворном, природном облику. У експериментима ће се користити растворени у диметил-сулфоксиду и разблажени у медијуму. Метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и листа *Teucrium pollium* су добијени на следећи начин. Након скупљања, листови су осушени, а плодови су коришћени свежи, одмах након брања. Листови наведених биљака, као и плод биљке *Ligustrum vulgare* су пребачени у флашице са тамним стаклом, а након тога је додато 200ml метанола. Након 24 часа, екстракти су филтрирани кроз филтер папир *Whatman No. 1*. Супернатанти су просушени у вакууму на 40°C ротирајућим испаривачем. Добијени екстракти су пребачени у стерилне епрувете и чувани у фрижидеру на 4°C. Непосредно пре експерименталних екстракти ће бити растворени у диметил-сулфоксиду и разблажени медијумом. Екстракти гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* су добијени на идентичан начин коришћењем мицелијума ових гљива.

У свим узорцима који буду укључени у студију одређиваће се вијабилност ћелија 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама испитиваних супстанци у односу на нетретирание ћелије применом МТТ теста, као и мерењем активности ослобођене лактат-дехидрогеназе применом LDH теста. Даља истраживања ће укључити само оне биоактивне супстанце које не утичу на вијабилност мононуклеара здравих особа, а у испитиваним концентрацијама делују цитотоксично на лимфоците леукемијских ћелијских линија MOLT-4 и JVM-13 и лимфоците изоловане из крви пацијената оболелих од HLL-а. Релативни однос некротичне и апоптотске смрти HLL-лимфоцита изазване испитиваним супстанцама испитаће се методом проточне цитометрије бојењем Annexin-ом V и 7-аминоактиномицином D. Имуноцитохемијским бојењем специфичним антителима за Вах, Bcl-2, цитохром c и активну каспазу-3 биће утврђена њихова ћелијска локализација у третираним и нетретираним леукемијским лимфоцитима. Такође, проточном цитометријом и бојењем специфичним антителима за Вах, Bcl-2, цитохром c и активну каспазу-3 прецизно ће се одредити просечан ниво експресије Вах-а и Bcl-2, односно проценат ћелија код којих је цитохром c транслоциран из митохондрија у цитоплазму а каспаза-3 активирана, у групи третираних у односу на нетретирание леукемијске лимфоците.

### **Снага студије и величина узорка**

Величина група је одређена на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 95%, вероватноће грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе. Укупна величина узорка (total sample size=54) израчуната је на основу програма *G power* и коришћењем теста корелације (Correlation: point biserial model). Вредност коефицијента детерминације ( $\rho^2$ ) је 0.2. После регрутације половине предвиђених испитаника биће учињена прелиминарна статистичка анализа на основу чијих резултата се укупни студијски узорак може смањити.

### **Статистичка обрада података**

Пре статистичке обраде података испитује се правилност расподеле добијених вредности. Ако је број вредности мањи од 50 за проверу ће се користити Shapiro-Wilk тест, за узорак већи од 50 користи се Kolmogorov-Smirnov тест. На основу добијене вредности р

одредиће се тест који ће се користити за статистичку анализу (параметарски Т–тест за  $p < 0.05$  или непараметарски Mann-Whitney-ев тест ако је  $p > 0.05$ ). За испитивање утицаја концентрације биоактивне супстанце на исход, користиће се тест регресије. Вредности добијених података ће се сматрати статистички значајним уколико је  $p < 0.05$ . За статистичку обраду података користиће се пакет SPSS 20. Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Добијени резултати биће приказани табеларно и графички.

## 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Сходно досадашњим сазнањима и постављеним циљевима, очекивани резултати студије би били:

1. Прополиси, хризин и метанолски екстракти биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* делују цитотоксично на леукемијске ћелије, а не делују цитотоксично на здраве мононуклеаре.
2. Наведене супстанце индукују апоптозу леукемијских лимфоцита.
3. Наведене супстанце повећавају релативни однос Вах/Bcl-2, што доводи до транслокације цитохрома с из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Хронична лимфоцитна леукемија (HLL) је малигно обољење хематопоезног ткива које настаје пролиферацијом и акумулацијом клона имунски некомпетентних В-лимфоцита у костној сржи, лимфним жлездама, слезини и другим органима услед продуженог живота лимфоцита. Обзиром да поремећај апоптозе није укључен само у процес леукемогенезе, већ је повезан и са резистенцијом оболелих од HLL-а на стандардну терапију, потребно је наћи нове агенсе који би реактивирали апоптозу HLL лимфоцита. Прополиси, хризин и екстракти биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis* индукују апоптозу појединих туморских ћелијских линија, али није познат њихов утицај на леукемијске лимфоците.

Основни циљ овог истраживања је да се испита цитотоксичност две различите врсте прополиса, хризина и екстракта биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на леукемијским ћелијским линијама и лимфоцитима изолованим из крви пацијената оболелих од HLL-а, као и на мононуклеарима изолованим из крви здравих особа (контрола).

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. За истраживање ће се користити две леукемијске ћелијске линије MOLT-4 и JVM-13, лимфоцити изоловани из узорака крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије који се лече у Клиници за хематологију Клиничког центра „Крагујевац“, док ће се мононуклеарни леукоцити контролне групе здравих испитаника добијати из узорака крви Службе за снабдевање крвљу и крвним производима КЦ „Крагујевац“.

Из свих узорака који буду укључени у студију, одређиваће се вијабилност ћелија 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама биоактивних супстанци у односу на нетретирание ћелије. Испитивања ће се спровести у лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука у Крагујевцу, а поред вијабилности ћелија, испитиваће се и утицај предложених

биоактивних супстанци на експресију и локализацију протеина укључених у апоптозу леукемијских лимфоцита. Као методе за одређивање ових параметара користиће се МТТ-тест, LDH тест, проточна цитометрија и методе имунофлуоресцентне микроскопије. У анализи прикупљених података користиће се методе дескриптивне статистике и тестирања хипотезе. Независне варијабле студије (узрок) представљаће примењене биоактивне супстанце, а зависне варијабле (исход), представљаће измерене вредности параметра вијабилности и апоптозе лимфоцита.

## 2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија. Проф. др Иванка Зелен поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања.

## 2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална интерна медицина.

## 2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник;
2. **Проф. др Наташа Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан;
3. **Проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;
4. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;
5. **Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан.

## Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Милана Зарића, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита ефекат и механизам деловања биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Милана Зарића под називом „**Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије**“ и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

**Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник

---

**Проф. др Наташа Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета  
Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан

---

**Проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета  
у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан

---

**Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,  
члан

---

**Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

---

У Крагујевцу, 19.01.2015. године