

ОБРАЗАЦ 6

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У.Т.Б. - 7
03.07.2024

Број предмета	Број предмета	Број предмета	Број предмета
05	6907		

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

и

ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ

УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 20.5.2024. године (број одлуке: IV-03-380/24) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности”, кандидата Александра Кочовића, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука, за коју су именовани коментори Недељко Манојловић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и Јована Новаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације: Екстракти лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> : фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикана, једначина и референци) (до 500 карактера): Докторска дисертација садржи 164 стране, подељена је на осам поглавља, цитирано је 184 референце. Коришћено је 17 једначина. Резултати су представљени кроз 16 слика, 20 табела и 62 графикана. Циљ студије било је добијање екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> , њихова фитохемијска карактеризација и одређивање биолошке активности, а затим испитивање потенцијалног кардиопротективног ефекта одабраног екстракта и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера): У овој студији одређен је фитохемијски састав екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> , који су добијени коришћењем различитих растварача, након чега је испитана њихова антиоксидациона, антимикуробна и антитуморска активност. Након тога испитан је потенцијални

кардиопротективни ефекат одабраног екстракта лишаја и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности са циљем да се утврди његово постојање као да се одреде могући механизми остваривања кардиопротективног ефекта.

1.4.Анализа испуњености полазних хипотеза:

На почетку истраживања постављене су следеће хипотезе:

1. Хемијски састав ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* разликује се у квалитативном и квантитативном аспекту.
2. Ацетонски, метанолни и п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* садрже фенолна и флавоноидна једињења
3. Ацетонски, метанолни и п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају антиоксидациону активност.
4. Ацетонски, метанолни и п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају антимикуробну активност.
5. Ацетонски, метанолни и п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају антитуморску активност.
6. Одабрани екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* има значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
7. Уснинска киселина, као секундарни метаболит лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, има значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
8. Потенцијални механизам кардиопротективног дејства екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* подразумева модулацију редокс статуса и процеса апоптозе.
9. Потенцијални механизам кардиопротективног дејства уснинске киселине, као секундарног метаболита лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, подразумева модулацију редокс статуса и процеса апоптозе.

1.5.Анализа примењених метода истраживања:

Методолошки приступ истраживањима у оквиру ове докторске дисертације је одговарајући и у потпуности усаглашен са постављеним циљевима и хипотезама. Докторска дисертација се може поделити на два дела. Први део дисертације односи се на фитохемијску карактеризацију и испитивање биолошке активности три различита екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, док се други део дисертације односи на испитивање кардиопротективног дејства одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. За припрему екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* коришћена су три различита растварача и то ацетон, метанол и п-хексан. Ови растварачи одабрани су због њихове различите поларности, као и различите способности екстракције различитих секундарних метаболита лишајева. За добијање екстраката одабрана је метода вишеструке мацерације чија је предност та што се избегава загревање екстраката, као и потенцијална разградња термолабилних активних састојака. Такође, литературни подаци указују да је вишеструка мацерација метода избора када је у питању екстракција лишајева. Након екстракције екстракти су упарени под сниженим притиском, како би се добили суви екстракти који ће бити коришћени у даљем току испитивања. Сви екстракти су анализирани методом хроматографије на танком слоју, у циљу прелиминарне фитохемијске анализе, а након тога сваки од екстраката испитан је методом високо ефикасне течне хроматографије (енгл. *High performance liquid chromatography - HPLC*) коришћењем система Agilent 1200 System који је упарен са UV детектором са опсегом рада од 200-800 nm, у циљу идентификације присутних компонената. Као мобилна фаза коришћен је систем растварача метанол-вода-фосфорна киселина (80:20:0,9 v/v/v), у изократском модалитету рада, док је брзина протока мобилне фазе била 1,0 mL/min. Инјектована количина узорка за анализу била је 10 µL. Лимит детекције и лимит квантификације примењене хроматографске методе одређен је применом смерница Интернационалне конференције за хармонизацију техничких захтева за регистрацију фармацеутика за хуману

употребу (енгл. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH*). Из ацетонског екстракта извршено је изоловање уснинске киселине применом техника растварања и кристализације. Испитивање биолошке активности екстракта подразумевало је испитивање антиоксидационог дејства, антимикуробног дејства укључујући и способност инхибиције формирања биофилма и антитуморског дејства. Испитивање антиоксидационог дејства подразумевало је одређивање укупног садржаја фенолних једињења применом методе са Folin–Ciocâlțeu реагенсом и са галном киселином као стандардом, односно укупног садржаја флавоноидних једињења применом методе са алуминијум-хлоридом и коришћењем кверцетина и рутина као стандарда. Антиоксидациони ефекат екстракта лишаја и уснинске киселине испитан је коришћењем пет различитих техника и то способности неутралисања 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил (DPPH) радикала, способности неутралисања супероксид-анјон радикала, способности неутралисања хидроксил радикала, одређивање укупног антиоксидационог капацитета применом методе са фосфомолибденском киселином и одређивања индекса инхибиције липидне пероксидације применом методе са линолном киселином. Антимикуробна активност екстракта и уснинске киселине испитана је применом микродилуционе методе на микротитар плочама са ресазурином као индикатором и то на 19 микроорганизама. Експериментом је било обухваћено 15 бактеријских сојева, шест стандардних сојева (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 и *Escherichia coli* ATCC 25922) и девет изолата (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*). Такође, тестирана су и четири соја гљива, два стандардна соја (*Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus niger* ATCC 16888) и два изолата (*Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans*). Антибиофилм активност тестираних екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине, испитана је кристал виолет методом и то на бактеријским сојевима *S. aureus* ATCC 6538 и *P. aeruginosa* за које је доказано да имају способност формирања биофилма. Испитивање антитуморског ефекта екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине је извршено на четири типа ћелијских линија: хумани карцином дојке (MDA-MB231), аденокарцином грлића материце (HeLa), карцином колона (HCT-116) и хумани нетрансформисани фибробласти плућа (MRC-5) применом МТТ теста након чега су одређени и следећи параметри цитотоксичности: Степен цитотоксичности (C(%)), Индекс селективности, Вредност потенцијала инхибиције раста (енгл. *Growth inhibitory potential - GI₅₀*), Вредност укупне инхибиције раста (енгл. *Total growth inhibition - TGI*) и Вредност леталне концентрације 50 (енгл. *Lethal concentration 50 - LC₅₀*).

У оквиру другог дела дисертације, испитивани су кардиопротективни ефекти екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и дибензофуранског једињења - уснинске киселине, као главног секундарног метаболита испитиваних екстракта, на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, као и потенцијални механизми кардиопротективног дејства. На основу фитохемијске карактеризације испитиваних екстракта, укупног садржаја фенолних и флавоноидних једињења и њиховог антиоксидационог потенцијала одређеног у *in vitro* условима, за рад са експерименталним животињама одабран је ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* као екстракт са најизраженијим антиоксидационим потенцијалом. У оквиру другог дела истраживања коришћени су одрасли Wistar albino пацови мушког пола набављени са Војномедицинске академије, старости 6-8 недеља, телесне масе 200-250 g. Све животиње су чуване у строго контролисаним условима. Животиње су насумично разврстане у осам група са по десет животиња. Ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* примењен је оралним путем у дози од 125 mg/kg растворен у минималној количини 1% раствора натријум-карбоксиметилцелулозе, док је уснинска киселина примењивана на исти начин, али у дози од 25 mg/kg. У оба случаја третман је трајао 28 дана.

На почетку експерименталног протокола животињама је измерен крвни притисак и урађена је ехокардиографска дијагностика у циљу праћења промене ових параметара на крају експерименталног протокола односно да би могао да се донесе закључак о томе да ли је изазвана кардиотоксичност. У свим групама у којима је планирано изазивање кардиотоксичности доксорубицин је примењен 28 дана од почетка експерименталног протокола и то у дози од 15 mg/kg телесне тежине пацова и то применом инјекције у интраперитонеални простор.

Крвни притисак код експерименталних животиња мерен је применом методе репне плетизмографије и то 31. дана од почетка експерименталног протокола непосредно пре жртвовања. У истом тренутку одређивани су и ехокардиографски параметри са посебним нагласком на фракционо скраћење и ејекциону фракцију. Вредности хемодинамских параметара у комбинацији са биохемијским и хистолошким налазом служи за потврђивање модела односно за потврду тога да је доксорубицин изазвао кардиотоксичност у наведеном режиму дозирања. Код експерименталних група исти параметри служе за праћење ефекта примењених третмана. Након жртвовања срца експерименталних животиња су изолована и испитан је утицај примењеног третмана на кардиодинамске параметре изолованог срца применом методе по *Langendorff*-у и то у протоколу ауторегулације који подразумева промену перфузионог притиска у распону од 40-120 центиметара воденог стуба (cmH₂O).

Приликом жртвовања животиње у циљу изоловања срца прикупљена је и крв експерименталних животиња у циљу одређивања параметра оксидационог стреса, биохемијских параметара и параметара инфламације. Крв је прикупљана у епрувете са натријум-цитратом као антикоагулансом након чега је центрифугирана у циљу одвајања серума и еритроцита. Од параметара оксидационог стреса из серума су одређени нивои прооксидационих параметара супероксид-анјон радикала, нитрита, водоник пероксида и индекс липидне пероксидације, док су из лизата еритроцита одређени нивои редукованог глутатиона, каталазе и супероксид-дисмутазе. Из ефлуента добијеног током *ex vivo* испитивања кардиодинамских параметара одређени су наведени прооксидациони параметри, док су из хомогената ткива миограда одређени сви параметри као и из крви. Из добијеног серума од биохемијских параметара одређени су и нивои С-реактивног протеина, лактатне дехидрогеназе, креатинфосфокиназе MB и тропонина I и то применом комерцијалних имуноензимских тестова високе осетљивости и селективности (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*). Ови параметри одабрани су јер могу да укажу на новонастало оштећење миокарда. Крв за одређивање наведених биохемијских параметара на почетку експерименталног протокола добијена је пункцијом из репне вене.

Добијени серум коришћен је и за одређивање параметара инфламације применом комерцијалних ELISA китова. Одређени су интерлеукин-1 α и интерлеукин-8 као проинфламаторни цитокини односно интерлеукин-4, интерлеукин-10 и трансформишући фактор раста β као антиинфламаторни цитокини. Ови параметри указују на улогу Th1 и Th2 имунског одговора у експерименталном протоколу.

По завршетку *ex vivo* протокола на *Langendorff* апарату срце је пажљиво уклоњено са система за ретроградну перфузују и скалпелом подељено на два дела, при чему је један део коришћен за патохистолошку анализу, а други за одређивање релативне експресије гена у левој комори срца. Патохистолошка анализа подразумевала је две врсте бојења и то хематоксилин-еозин за уочавање грађе ћелија и Picrosirius red за одређивање садржаја колагена у узорцима и доказивање постојања фиброзе.

Релативна експресија гена у левој комори срца испитана је коришћењем комерцијално доступних китова за реверзну транскрипцију и квантитативну PCR анализу. Одређивана је релативна експресија следећих гена: SOD-1, SOD-2 и eNOS као гена удружених са оксидационим стресом, Bax, Bcl-2, Cas-3 и Cas 9 као гена удружених са апоптозом и IL-10, NF- κ B, TNF α , IL-6 и IL-13 као гена удружених са инфламацијом. Као housekeeping ген коришћен је ген за β -актин.

1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

Циљеви ове докторске дисертације били су следећи:

1. Фитохемијска карактеризација ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
2. Евалуација и компарација антиоксидационих ефеката ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
3. Евалуација и компарација антимикуробних ефеката ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
4. Евалуација и компарација антитуморских ефеката ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
5. Евалуација и компарација кардиопротективних ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
6. Евалуација и компарација ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на редокс статус пацова којима је доксорубицином изазвана кардиотоксичност.
7. Испитивање потенцијалних механизма кардиопротекције изазване применом одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.

По завршетку ове докторске дисертације сви постављени циљеви докторске дисертације су у потпуности испуњени.

1.7.Анализа добијених резултата истраживања и списак објављених научних радова кандидата из докторске дисертације (аутори, наслов рада, назив часописа, волумен, година објављивања, странице од-до, DOI број¹, категорија):

- Применом различитих растварача за екстракцију лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* добијају се екстракти различитог квантитативног и квалитативног састава
- Идентификовано је четири секундарна метаболита лишајева и то: леканорна киселина, обтусична киселина, уснинска киселина и атранорин.
- Присуство леканорне киселине, обтусичне киселине и уснинске киселине утврђено је у свим испитиваним екстрактима, док је атранорин идентификован само у п-хексанском екстракту.
- Највећи укупни принос екстракције измерен је у случају ацетонског екстракта.
- Највећи садржај леканорне киселине измерен је у ацетонском екстракту, највећи садржај обтусичне киселине у метанолном екстракту, а највећи садржај уснинске киселине у п-хексанском екстракту.
- Највећи садржај укупних фенолних једињења и укупних флавоноидних једињења измерен је у ацетонском екстракту, након кога следе метанолни и п-хексански екстракт.
- Најизраженију антиоксидациону активност *in vitro* условима, применом било које од метода, испољио је ацетонски екстракт, а затим метанолни и п-хексански екстракт.
- Најизраженију антибактеријску и антибиофилм активност испољио је п-хексански екстракт и то посебно према Грам-позитивним бактеријским сојевима.
- Најизраженију антигљивичну активност испољио је п-хексански екстракт, а посебно према стандардном соју гљивеце *S. cerevisiae*.
- Најизраженију антитуморску активност испољио је ацетонски екстракт и то према свим испитиваним ћелијским линијама.
- Доксорубицин примењен у кумулативној дози од 15 mg/kg телесне тежине животиње изазива кардиотоксичност код експерименталних животиња.

¹ Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

- Раствор натријум-карбоксиметилцелулозе у концентрацији од 1% нема утицаја на било који од испитиваних параметара срчане функције, биохемијске параметре оштећења миокарда, оксидациони статус у коронарном венском ефлуенту, крви и хомогенату ткива миокарда, патохистолошке карактеристике миокарда, параметре инфламације и релативну експресију испитиваних гена, а такође не испољава ни протективно дејство на наведене карактеристике, па се због тога може сматрати одговарајућим вехикулумом за истраживање
- Самостална примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg не утиче значајно на ниво одређиваних параметара срчане функције, биомаркере оштећења миокарда, оксидациони статус одређиван у коронарном венском ефлуенту, крви и хомогенату ткива миокарда, патохистолошке карактеристике миокарда, параметре инфламације и релативну експресију испитиваних гена.
- Самостална примена уснинске киселине у дози од 25 mg/kg не утиче значајно на ниво одређиваних параметара срчане функције, биомаркере оштећења миокарда, оксидациони статус одређиван у коронарном венском ефлуенту, крви и хомогенату ткива миокарда, патохистолошке карактеристике миокарда, параметре инфламације и релативну експресију испитиваних гена.
- Самостална примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg или уснинске киселине у дози од 25 mg/kg не доводи до испољавања било каквих значајних штетних или токсичних ефеката, односно може се тврдити да су ова два третмана у примењеним дозама безбедна за примену код експерименталних животиња у циљу утврђивања постојања кардиопротективног ефекта.
- Примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до очувања хемодинамских параметара какви су систолни и дијастолни крвни притисак, срчана фреквенција и фракционо скраћење у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине умањује депресорно дејство доксорубицина на кардиодинамске параметре при чему је дејство ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* израженије у поређењу са уснинском киселином.
- Примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине редукују ниво прооксидационих параметара, а посебно ниво супероксид-анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до смањења нивоа свих испитиваних системских прооксидационих параметара у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином изузев нитрита у случају третмана уснинском киселином.
- Примена ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до повећања нивоа свих испитиваних системских антиоксидационих параметара у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином при чему је тај ефекат израженији у групи која је третирана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla*.
- У хомогенату ткива миокарда значајно је смањен ниво супероксид-анјон радикала и водоник пероксида у случају третмана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином, односно ниво водоник пероксида у случају третмана уснинском киселином пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Ниво свих параметара система антиоксидационе заштите у хомогенату ткива миокарда значајно је повишен у групама третираним ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинском киселином пре пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином, односно ниво водоник пероксида у случају третмана

уснинском киселином пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином са изузетком каталазе у случају третмана уснинском киселином.

- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења нивоа свих срчаних ензима у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином при чему је ефекат ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* израженији.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења нивоа проинфламаторних цитокина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања нивоа антиинфламаторних цитокина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног побољшања патохистолошког налаза ткива миокарда у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења садржаја колагена у ткиву миокарда у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања нивоа антиинфламаторних цитокина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом значајно је смањена у групама третираним ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинском киселином пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином при чему је ефекат у групи третираној уснинском киселином израженији.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања релативне експресије гена за Bcl-2 у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином односно оба третмана имају изражен антиапоптоски ефекат.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања релативне експресије гена за IL-10 у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином односно оба третмана имају изражен антиинфламаторни ефекат.
- Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења релативне експресије проинфламаторних гена за IL-13 и TNF α у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Примена уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења релативне експресије свих испитиваних проинфламаторних гена у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
- Сумарни ефекат примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине указује да оба третмана испољавају кардиопротективно дејство на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
- Као главни потенцијални механизми кардиопротективног дејства издвојили су се смањење оксидационог стреса и утицај на процес апоптозе.
- Неопходна су додатна истраживања како би се детаљно испитао механизам кардиопротективног дејства на моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности на ћелијском нивоу.

Резултати из докторске дисертације су публиковани у једном оригиналном научном раду:

Kocovic A, Jeremic J, Bradic J, Sovrljic M, Tomovic J, Vasiljevic P, Andjic M, Draginic N, Grujovic M, Mladenovic K, Baskic D, Popovic S, Matic S, Zivkovic V, Jeremic N, Jakovljevic V, Manojlovic N. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity of Different Extracts of *Xanthoparmelia stenophylla* Lichen from Stara Planina, Serbia. *Plants-Basel*. 2022; 11(13):1624. doi: 10.3390/plants11131624. **M21**

1.8. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области и анализа извештаја о провери докторске дисертације на плагијаризам (до 1000 карактера):

Претрагом доступне литературе помоћу биомедицинских база података „Medline“ и „KoBSON“, коришћењем одговарајућих кључних речи: *Xanthoparmelia stenophylla*, lichens, doxorubicin induced cardiotoxicity, usnic acid, cardioprotection и њиховим комбиновањем нису пронађене студије истог дизајна и методологије.

Извештај о плагијаризму показао је минималан степен преклапања и то само као последица навођења библиографских података о коришћеној литератури или општих података у методологији који се подударају са методологијом коришћеном у сличним истраживањима. Осим тога, у целини су поштована сва академска правила која се односе на цитирање резултата истраживања других аутора.

Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Александра Кочовића под називом „Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“ представља резултат оригиналног научног рада.

1.9. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области:

Доксорубицин је цитостатик из групе антрациклинских антибиотика који се због своје ефикасности и селективности веома често користи у модерној онкологији, а посебно у третману тумора јајника, дојке, бешике, саркома, Хочкиновог и нон-Хочкиновог лимфома и акутне лимфобластне леукемије. Као најважније и најозбиљније нежељено дејство доксорубицина издваја се кардиотоксичност. Кардиотоксичност изазвана применом доксорубицина је дозно зависна и чешће се јавља у ситуацијама када се прекорачи препоручена терапијска доза. Симптоми кардиотоксичности су отежано дисање, бол у грудима, палпитације, вртоглавица и отоци око чланака, а најважнија последица овог нежељеног дејства је то што терапија доксорубицином мора да буде прекинута. Сматра се да је у основи настанка доксорубицином изазване кардиотоксичности повећање нивоа оксидационог стреса и нарушен процес апоптозе што је посебно изражено у ћелијама миокарда.

Постоји велики број истраживања у којима се испитује кардиопротективни ефекат различитих природних и синтетских супстанци какве су алицин, куркумин и ресвератрол, а све са циљем откривања супстанце која ће неутралисати токсичан ефекат доксорубицина на миокард, без утицаја на цитостатско дејство доксорубицина и без других токсичних ефеката.

Лишајеви су организми који представљају специфичну симбиотску заједницу гљиве (микобионта), која чини потпуно ткиво лишајева и обезбеђује довољну количину воде, и организма способног да врши фотосинтезу (фотобионта) најчешће цијанобактерије или модрозелене алге. Оно по чему су лишајеви специфични јесте продуковање великог броја различитих секундарних метаболита различитих хемијских структура. Због тога лишајеви представљају богат ресурс најразличитијих једињења са широким спектром биолошких активности. У оквиру првог дела овог истраживања испитан је фитохемијски састав три различита екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* чиме је дат допринос општем познавању заступљености идентификованих секундарних метаболита (леканорне киселине, обтусичне

киселине, уснинске киселине и атранорина) у овој врсти. Поред тога, испитана је антиоксидациона, антимикробна, антибиофилм и антитуморска активност припремљених екстраката. Истовремено, резултати овог дела истраживања послужили су у одабиру екстракта који ће бити коришћен у другом делу истраживања, односно у испитивању на експерименталним животињама.

У другом делу истраживања испитан је кардиопротективни ефекат ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као и изолованог дибензофуранског једињења уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Иако постоји велики број истраживања којима је у фокусу управо уснинска киселина, њен кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности није претходно испитиван што је случај и са наведеним екстрактом. На овај начин проширен је спектар истраживања кардиопротективних ефеката једињења пореклом из природе на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Оба примењена третмана испољила су запажен кардиопротективни ефекат на овом експерименталном моделу. Може се запазити утицај оба третмана на системске и ткивне параметре оксидационог стреса, као и смањење релативне експресије гена удружених са оксидационим стресом. Такође, код оба третмана запажена је повећана релативна експресија гена за Bcl-2, односно изражен је антиапоптоТСки ефекат.

Ово истраживање може представљати темељ за испитивање кардиопротективног ефекта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у другим експерименталним моделима, као и за испитивање кардиопротективног ефекта других врста лишајева и њихових секундарних метаболита на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Такође, неопходна су додатна истраживања како би се детаљније испитао могући механизам кардиопротективног дејства ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у уснинске киселине.

1.10. Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):

На основу анализе достављене документације Комисија констатује да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације кандидата Александра Кочовића под називом „Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности” у складу са студијским програмом Докторских академских студија, општим актом Факултета медицинских наука и општим актом Универзитета у Крагујевцу.


2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности”, кандидата Александра Кочовића, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:

Мирослав Соврић, доцент

Факултет медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу

Фармацеутска анализа


Председник комисије

Исидора Милосављевић, доцент

Факултет медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу

Фармацеутска биотехнологија


Члан комисије

Перица Васиљевић, редовни професор

Природно-математички факултет Универзитета у
Нишу

Експериментална биологија и биотехнологија


Члан комисије