

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/42 од 13.07.2016. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата магистра фармације Милене Дељанин под називом:

„Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*”.

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник
2. Проф. др Михајло Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан.
3. Др Александра Ристић-Фира, научни саветник, Институт за нуклеарне науке "Винча", Београд, члан.
4. Доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
5. Доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу следећи

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидаткиња, магистар фармације Милена Дељанин, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Магистар фармације Милена Дељанин рођена је 02.05.1987.године у Крушевцу. Гимназију у Крушевцу, природно-математички смер, завршила је 2006. године. Фармацеутски факултет у Београду завршила је 2012. године, са просечном оценом 8,47. Стаж у трајању од годину дана обавила је у галенској лабораторији, а потом и у апотеци, код послодавца "Апотека Крушевац". Након завршеног стажа, положила је стручни испит. Од јула 2013. године до јануара 2015. године радила је у апотеци здравствене установе "С-фарм" као руководица огранка. Од јануара 2015. године ради као асистент у Високој струковној школи за васпитаче Крушевац, а од почетка 2016. године волонтира и у Институту за нуклеарне науке Винча у Београду. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, уписала је 2012. године.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: "Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*".

Предмет: Ова студија ће се бавити испитивањем директног и индиректног антитуморског деловања екстракта биљке *Chelidonium majus in vitro*.

Хипотезе: Екстракт *C. majus* изазива апоптозу туморских ћелија, а не утиче на вијабилност здравих ћелија, делује синергистички са цитостатицима, инхибира миграцију туморских ћелија и повећава осетљивост малигних ћелија на зрачење.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидаткиња је испунила потребан услов за пријаву докторске тезе – објавила је рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор:

Milena Nikolić, Mladen Nikolić, Dragan Nikolić, Sretko Ilić. Toxic effects of carbonic acid dichloride and influence of chromium on service life and sorption capacity of filters. *Ecologica*. 2014, 75: 566-569. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Проналажење нових антитуморских агенаса је императив у савременој онкологији. Цитостатици који се користе у терапији канцера нису селективни, оштећују и нормалне ћелије, доводе до системске токсичности и развоја резистенције на ове лекове. Зато се намеће потреба за проналажењем агенаса који ће деловати на циљне молекуле који су значајни за настанак, прогресију и метастазирање тумора. Веома значајан извор нових лекова представљају биоактивне компоненте природних производа. Данас се зна да су биљке нарочито богат извор једињења која имају јака антиоксидативна и имуномодулаторна својства и имају утицај на регулацију гена, пролиферацију и апоптозу малигнућ ћелија.

Chelidonium majus L. (Papaveraceae) се вековима користи у традиционалној и народној медицини широм света. Ова биљка, која је у Србији позната и под називом Божји дар, у народној медицини има примену у лечењу веома широког спектра различитих болести. Користи се за лечење болести желуца, јетре, слезине и црева, реуматских болести, плућних болести, срчаних тегоба, неуро­за и депресије, инфекција уринарног тракта, за уклањање катаракте, као спазмолитик. Свеж сок се користи за уклањање брадавица и лечење вирусних, бактеријских и гљивичних инфекција коже. Такође, чај и тинктура се користе у третману различитих малигнитета. Широ­к спектар биолошких активности *S. majus* остварује се захваљујући присуству великог броја алкалоида (хелидонин, хо­мохелидонин, хелеритрин, сангвинарин, берберин, коп­тизин, протопин), хелидоцистатина, неколико флавоноида и фенолних киселина, витамина Ц и каротена. Фармаколошка својства ове биљке су предмет великог броја истраживања *in vitro* и *in vivo*, као и клиничких студија. Показано је њено антими­кробно, антиинфламаторно, имуномодулаторно, гастропротективно, холеретично, хепатопротективно, аналгетичко, спазмолитичко и антитуморско дејство. Међутим, највећи број истраживања, поготову истраживања антитуморског дејства, усмерен је на испитивање биолошке активности појединачних, изолованих алкалоида и флавоноида, док је мало радова који испитују дејство целокупног екстракта *S. majus*. Биљке садрже сложене мешавине једињења која

могу бити моноспецифична (специфична за један циљни молекул), али већина има плејотропно дејство. Биоактивно дејство ових компоненти може да буде и адитивно или синергистичко. Такође, у процесу изоловања и пречишћавања појединачних компоненти њихова биолошка активност може бити смањена. Зато је циљ овог истраживања испитивање дејства целокупног екстракта *C. majus*. Антитуморско дејство екстракта *C. majus* није довољно испитано. Иако су студије *in vitro* и *in vivo* малобројне, резултати су обећавајући и указују на оправданост даљих истраживања.

2.5. Значај и циљ истраживања

Добијени резултати ће показати да ли је оправдано даље испитивање екстракта као потенцијалног терапеутика (примарног или додатног) или као агенса који ће омогућити да се смање нежељена дејства стандардне терапије канцера. Задовољавајући резултати отворили би могућности за даља испитивања која би могла да омогуће примену екстракта у одређеним терапијским протоколима. Поред тога, ниски трошкови и једноставност добијања екстракта *C. majus* говоре у прилог оправданости овакве врсте студије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Биљке садрже смешу биолошки активних једињења која делују различитим механизмима, и у тој смеси могу испољити синергистички или адитивни ефекат. Највећи број истраживања *C. majus* односи се на истраживање биолошке активности изолованих алкалоида. Антипролиферативни и проапоптотски ефекти хелидонина, стилопина и сангвинарина доказани су у бројним студијама *in vitro*. Синтетски дериват добијен коњугацијом тиофосфорне киселине и три молекула хелидонина, Ukrain[®], налази се у фази клиничких испитивања, као изузетно потентан агенс у терапији канцера дебелог црева, панкреаса и дојке. Висока селективност за канцерске ћелије, без ефекта на околно здраво ткиво, уз стимулацију имунског одговора, доприносе високој ефикасности овог агенса, а показано је да у великом проценту повећава преживљавање оболелих пацијената. Студије које се односе на испитивање антитуморске активности целокупног екстракта су малобројне, али су резултати обећавајући и указују на оправданост даљих истраживања.

2.7. Методе истраживања

1. Дејство екстракта на вијабилност туморских ћелијских линија и фибробласта одређиваће се 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама екстракта у односу на нетретиране ћелије применом МТТ теста и SRB теста .

Сва даља истраживања вршиће се на најинвазивнијим ћелијским линијама (A549, MDA-MB-231 и HCT116) 24-часовном инкубацијом са концентрацијом екстракта која одговара средњој цитотоксичној концентрацији, или, у неким експериментима, са нетоксичним концентрацијама.

2. Тип ћелијске смрти одредиће се методом проточне цитометрије ћелија бојених Annexin-ом V и 7-AAD и анализом морфолошких промена ћелија обојених мешом боја акридин оранж и етидијум бромид .

3. Анализом ћелијског циклуса на проточном цитометру утврдиће се да ли испитивани екстракт зауставља раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

4. Тестом инхибиције миграције утврдиће се да ли испитивани екстракт утиче на миграцију малигнућ ћелија.

5. Евентуално адитивно или синергистичко дејство са цитостатицима утврдиће се коинкубацијом ћелија са екстрактом и цитостатицима (доксорубицин).

6. Утицај на радиосензитивност малигнућ ћелија утврдиће се излагањем третираних и нетретираних ћелија γ -зрацима (1-4Gy) и одређивањем инхибиције раста помоћу МТТ теста и клоногеног теста.

2.7.1 Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на хуманим ћелијским линијама *in vitro*.

2.7.2. Варијабле које се мере у студији

Независну варијаблу студије (узрок) представљаће примењени екстракт *S. majus*, а зависне варијабле (исход), представљаће вредности мерених параметара.

2.7.3. Снага студије и величина узорка

Прорачун студијског узорка је заснован на подацима прелиминарних истраживања цитотоксичности екстракта у неколико ћелијских линија, у различитим временским периодима. Установљено је да је цитотоксично дејство дозно зависно, да се повећава са временом изложености, да се IC50 налазе у рангу 102 микрограма по милилитру и да је њена стандардна девијација око једне трећине. Критеријум за референтну цитотоксичност је постојање IC50 вредности испитиваног агенса бар 20 микрограма по милилитру, при чему је прихватљива граница не-инфериорности постављена на 5 микрограма по милилитру. Методолошка упутства у овој области препоручују одређивање криве доза-одговор испитиваног претпостављеног цитотоксичног агенса коришћењем сваке концентрације у бар трипликату. На основу ових података прорачун узорка је претпостављен за очекивану вредност не мању од 90 микрограма по милилитру, са SD не мањом од 30 микрограма по милилитру, за тест неинфериорности на једном узорку. Коришћењем одговарајућег онлајн калкулатора (<http://powerandsamplesize.com/Calculators/Test-1-Mean/1-Sample-Non-Inferiority-or-Superiority>) добијен је узорак од бар 2 понављања трипликата (укупно 6 понављања сваке испитиване концентрације). Овај број је увећан дуплирањем (фактор сигурности) у случају да IC50 буде нижа, са већом варијабилношћу и/или присуством непараметарске расподеле података, тако да је минимални број понављања трипликата утврђен на 4 (укупно 12 понављања сваке испитиване концентрације, односно 4 независна експеримента).

2.7.4. Статистичка анализа

Најпре ће се испитати правилност расподеле добијених вредности. Ако је број вредности мањи од 50 користиће се Shapiro-Wilk тест, за узорак већи од 50 користи се Kolmogorov-Smirnov тест. На основу добијене p вредности одредићемо тест који ћемо користити за статистичку анализу (параметарски T – 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 сматраће се статистички значајним уколико је $p < 0.05$. За статистичку обраду података користиће се пакет SPSS 20. Резултати експеримента биће изражени као средња вредност \pm стандардна девијација и биће приказани табеларно и графички.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Планирана истраживања ће показати да ли екстракт *C. majus* показује директно и/или индиректно антитуморско дејство.

Очекивано директно антитуморско дејство:

1. Екстракт делује цитотоксично на све туморске ћелијске линије, док на фибробласте не испољава цитотоксични ефекат.
2. Екстракт изазива апоптозу у туморским ћелијама.
3. Екстракт зауставља раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.
4. Екстракт показује синергистичко дејство са цитостатицима.

Очекивано индиректно антитуморско дејство:

1. Екстракт утиче на миграцију малигних ћелија.
2. Екстракт повећава осетљивост малигних ћелија на зрачење.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Цитостатици који се користе у савременој терапији не делују селективно, већ поред туморских ћелија делују и на здраве ћелије, због чега узрокују читав спектар нежељених дејстава, од оних који су непријатни за пацијента до врло озбиљних попут оштећења срца. Због тога се намеће потреба за проналажењем агенаса који ће деловати искључиво на туморске ћелије, и који ће примену наћи као примарна терапија или као додатна терапија, уз смањену дозу цитостатика првог избора, што би резултовало смањењем нежељених дејстава. Биљке су, као богат извор биолошки активних једињења која имају антиоксидативно, имуномодулаторно и антипролиферативно дејство, предмет бројних истраживања.

Директни и индиректни антитуморски ефекти екстракта *Chelidonium majus* биће испитани бројним методама. Директан антитуморски ефекат на туморским ћелијским линијама дојке, плућа и колоне испитиваће се тестовима цитотоксичности, детекцијом апоптозе/некрозе, анализом ћелијског циклуса, као и коикубацијом са цитостатицима (доксорубицином).

Цитотоксичност ће се одређивати након изложености туморских ћелија и фибробласта различитом опсегу концентрација екстракта, након чега се спроводе колориметријски тестови МТТ и SRB. Интензитет љубичасте (МТТ), односно жуте (SRB) боје која настаје мери се на спектрофотометру, на таласној дужини од 550nm. Све остале

методе спроводиће се на најинвазивнијим ћелијским линијама (A549, MDA-MB-231, HCT116). Детекција апоптозе/некрозе спроводиће се након излагања ћелија екстракту у концентрацији која показује цитотоксични ефекат, на проточном цитометру уз коришћење Anexin V/7-AAD. На исти начин, коришћењем пропиридијум-јодида, утврдиће се да ли екстракт зауставља ћелијски циклус у одређеној фази, и на тај начин испољава антипролиферативни ефекат. Врста интеракције са доксорубицином одредиће се помоћу МТТ теста комбиновањем различитих концентрација цитостатика и екстракта. На овај начин ће се утврдити да ли би испитивани екстракт могао да се користи као додатна терапија цитостатицима.

Индиректно цитотоксично дејство испитиваће се тестом инхибиције миграције и тестом којим ће се установити ефекат екстракта на радиосензитивност. Тест инхибиције миграције показује да ли екстракт инхибира кретање ћелија након формираног ожилка, у односу на нетретиране ћелије као контролу. Инхибиторно дејство екстракта указало би на могућу примену у спречавању метастазирања тумора. Утицај на радиосензитивност биће испитан на тај нај начин што ће ћелије бити третиране нетоксичним концентрацијама екстракта, а потом зрачена γ -зрацима и упоређиване са нетретираном контролом. Клоногеним тестом утврдиће се преживљавање и способност формирања колонија седам дана након зрачења. Овим испитивањем утврдиће се да ли екстракт повећава осетљивост туморских ћелија на зрачење, па би примену могао наћи у терапији за постизање бољег ефекта зрачења.

Добијени резултати указују на потенцијал екстракта *Chelidonium majus* као примарног агенса у терапији канцера, или као додатне терапије.

3. Предлог ментора

За ментора докторске дисертације под називом "Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*" кандидата Милене Дељанин предлаже се др Сузана Поповић, научни сарадник за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Предложени ментор испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9, за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Релевантне референце које су из области теме докторске дисертације:

1. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, Todorovic D, Djurdjevic P, Zaric M, Stankovic M, Todorovic M, Avramovic D, **Popovic S**. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 2016;190:362–371. **M21** (IF=3,055)
2. 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):189-195. **M22** (IF=2,722)
3. Radovanovic A, Cupara S, **Popovic S**, Tomovic M, Slavkovska V, Jankovic S. Cytotoxic effect of *Potentilla reptans*. L. rhizome and aerial part extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research* 2013; 70(5):851-854. **M23** (IF=0,847)
4. **Popovic S**, Urbán E, Lukic M, Conlon JM. Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of acne vulgaris. *Peptides*. 2012; 34(2):275-282. **M22** (IF=2,471)
5. **Popovic S**, Baskic D, Djurdjevic P, Zelen I, Mitrovic M, Nikolic I, Avramovic D, Radenkovic M, Arsenijevic N. Endoplasmic reticulum stress associated with caspases-4 and -2 mediates korbazol-induced B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis. *J BUON*. 2010; 15(4):783-790. **M23** (IF=0.482)
6. Baskic D, Ilic N, **Popovic S**, Djurdjevic P, Ristic P, Avramovic D, Arsenijevic N. *In vitro* induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by two natural products: preliminary study. *J BUON*. 2010; 15(4):732-739. **M23** (IF=0.482)
7. Bugarcic Z, Petrovic B, Bugarcic Z, Jankovic S, Jankovic S, Lukic G, Novakovic M, Kostovic V, **Popovic S**, Djurdjevic P, Baskic D, Arsenijevic N. Effects of cisplatin and other Pt(II) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct. *Toxicology in Vitro*. 2008; 22:1878-1882. **M22** (IF=2.473)

4. Научна област дисертације

Медицина и фармација.

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник
2. Проф. др Михајло Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан.
3. Др Александра Ристић-Фира, научни саветник, Институт за нуклеарне науке "Винча", Београд, члан.
4. Доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
5. Доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Закључак и предлог Комисије

На основу досадашњег научно- истраживачког рада, кандидат магистар фармације Милена Дељанин, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата мр. фарм. Милене Дељанин, под називом "Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*" и одобри њену израду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. Др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
председник

Проф. др Михајло Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан

Др Александра Ристић-Фира, научни саветник, Институт за нуклеарне науке "Винча",
Београд, члан

Доц. др Владислав Волареввић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

У Крагујевцу, 27.07.2016. године