

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију</p> <p>11.09.2017. године, Наставно-научно веће Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>1. Проф. др Момир Миков, редовни професор, Фармакологија са токсикологијом, 05.07.1999., Медицински факултет Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. Доц. др Светлана Голочорбин-Кон, доцент, Фармација, 15.07.2013., Медицински факултет Универзитета у Новом Саду</p> <p>3. Проф. др Силва Добрић, редовни професор, Фармакологија са токсикологијом, 22.11.2007., Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Небојша (Миливој) Павловић</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 19.10.1985., Суботица, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив:</p> <p>Медицински факултет Универзитета у Новом Саду, основне студије фармације, дипломирани фармацеут</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:</p> <p>2010., докторске академске студије клиничке медицине</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:
Улога жучних киселина у епигенетској регулацији оксидативног стреса и апоптозе у нормалним и малигним ћелијама
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:
Докторска дисертација кандидата Небојше Павловића је написана систематично, јасним и разумљивим стилем на 204 странице. Садржи све неопходне делове научног рада који су организовани у 7 поглавља: увод, радне хипотезе и циљеви истраживања, материјал и

методе, резултати, дискусија, закључак и литература. Дисертација садржи 10 слика, 73 графикана и 48 табела. Литература са 298 референци у складу је са важећим правилима за цитирање. На почетку докторске дисертације дата је кључна документација са изводом на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасно и прецизно формулисан, у складу са садржајем истраживања.

Поглавље **Увод** је написано систематично са детаљним прегледом савремених сазнања о изучаваној проблематици. У уводу докторске дисертације кандидат најпре даје основне податке о структурним карактеристикама жучних киселина, њиховој физиологији, рецепторима за које се вежу и ћелијским сигналним путевима у које су укључене. Након тога, дат је детаљан приказ молекуларних патогенетских механизма холестазе, инфламаторне болести црева и карцинома колона, а анализирана је и укљученост рецептора за жучне киселине у сигналне путеве који доприносе развоју ових стања. На крају увода, аутор се осврће на епигенетске аспекте канцерогенезе и улогу инхибитора хистон деацетилаза у терапији малигнух болести, као и на потребу за унапређењем терапијских стратегија које садрже епигенетске антитуморске лекове, нарочито код солидних тумора који показују висок степен резистенције према овим лековима. Литературни преглед у оквиру увода је актуелан и опсежан.

Комисија сматра да увод пружа савремен и свеобухватан приказ проблематике којом се истраживање бави. Указано је на уочени проблем и на детаље који још нису разјашњени. Дефинисано је подручје истраживања и прецизно су објашњени разлози истраживања.

У поглављу **Радне хипотезе и циљеви истраживања** јасно су дефинисани основни задаци истраживања и омогућују доношење конкретних закључака. У складу са поставком експерименталног дела доктората да се детаљно утврде функције жучних киселина у *in vitro* и *in vivo* системима, основни циљеви истраживања су били да се испита утицај жучних киселина на показатеље оксидативног стреса и антиоксидативне одбране, као и на експресију гена који кодирају синтезу протеина укључених у процесе инфламације, апоптозе и антиоксидативне заштите у јетри и интестинуму пацова код којих је изазвана холестаза. Поред тога, циљ рада је био да се испита утицај жучних киселина на антитуморску активност епигенетског агенса вориностата у НТ-29 ћелијској линији хуманог аденокарцинома колона, као и на процесе апоптозе и оксидативног стреса у ћелијама ко-третираним вориностатом и жучним киселинама. Хипотезе су јасно формулисане у односу на постављене циљеве истраживања, логичне и засноване на добро аргументованим основама.

Комисија сматра да су циљеви истраживања јасно и прецизно дефинисани, а хипотезе постављене адекватно у односу на циљеве истраживања, те у потпуности усклађени са формулацијама наведеним у пријави теме докторске дисертације.

Материјал и методе одговарају принципима методологије научно-истраживачког рада и принципима добре лабораторијске праксе. Методологија је јасно и прецизно описана у раду. Истраживање је изведено на Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета у Новом Саду, Заводу за фармацију Медицинског факултета у Новом Саду и у Лабораторији за експерименталну онкологију Института за онкологију Војводине, у периоду од фебруара 2013. године до септембра 2015. године. Експериментални део је подељен у два дела у циљу испитивања фармаколошких ефеката примене жучних киселина у *in vivo* и *in vitro* системима. Најпре су испитани ефекти полусинтетске жучне киселине 12-монокетохолне киселине, у поређењу са урсоеоксихолном и хенодеооксихолном киселином, на моделу интрахепатичне холестазе код лабораторијских пацова соја *Wistar*, а затим су испитане *in vitro* ефекти истих жучних киселина на ћелијској линији хуманог аденокарцинома колона НТ-29. Сви огледи на животињама су вршени у складу са Законом о добробити огледних животиња и директивама Европске Уније (2010/63/EU) и за њихово извођење је добијена сагласност Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду. У *in vitro* огледима је најпре помоћу МТТ теста испитан утицај одабраних жучних киселина на цитотоксичност епигенетског антитуморског лека вориностата. Испитан је и ниво експресије

гена укључених у процесе апоптозе, антиоксидативне заштите и инфламације у јетри и интестинуму експерименталних животиња са индукованом холестазом, као и у НТ-29 ћелијама карцинома колона, применом qRT-PCR методе. Такође, у *in vitro* и *in vivo* системима одређена је и активност антиоксидативних ензима биохемијским кинетичким спектрофотометријским методама.

Комисија сматра да су примењене методе истраживања описане јасно и детаљно чиме се у потпуности омогућава понављивост експеримената. Изабране методе статистичке обраде података у потпуности су адекватне и примерене истраживачком задатку. Комисија сматра да је избор коришћених метода испитивања адекватан што обезбеђује добијање поузданих резултата у складу са постављеним циљевима дисертације.

Резултати испитивања су уверљиво, прегледно и стручно приказани табеларно и графички. Сви табеларни и графички прикази праћени су јасним текстуалним тумачењима. Резултати су подељени у више целина због разумљивости и јасно демонстрирају претходно текстуално објашњене елементе. Резултати произлазе из примењене методологије уз коришћење адекватних статистичких метода. Добијени резултати у оквиру ове дисертације дају оригиналан допринос разумевању утицаја жучних киселина на регулацију процеса апоптозе и оксидативног стреса у интестинуму експерименталних животиња и у култури ћелија карцинома колона, као и укључености епигенетских механизма у остваривању дејстава испитиваних жучних киселина.

Комисија сматра да су резултати у овој дисертацији приказани на систематичан и прегледан начин, логичним редоследом и да су свеобухватни и јасни за интерпретацију.

Дискусија је свеобухватна и јасно написана, објективно анализира приказане резултате, по редоследу који је логичан, тако да представља хармоничну целину. Кандидат аргументовано и критички анализира резултате истраживања и компарира их са релевантним наводима из литературе. Литературни подаци су адекватно одабрани, актуелни и релевантни за извођење валидних закључака из проучаване проблематике. Коментари и тумачења резултата су логични. Дискусија добијених резултата је исцрпна, научно утемељена, те указује на завидно познавање проучаване проблематике уз критички осврт у односу на актуелну литературу.

Комисија сматра да је дискусија добијених резултата исцрпна, правилно и критички постављена и уверљива. Прецизно су истакнуте сличности и разлике између резултата добијених у дисертацији и резултата из литературе.

У поглављу **Закључак**, на основу добијених резултата и дискусије изведени су јасни и концизни, научно засновани и поуздани закључци.

Комисија сматра да закључци произлазе из постављених циљева, примењене методологије и резултата истраживања.

Поглавље **Литература** садржи списак 298 литературних навода цитираних по Ванкуверским правилима на прописан начин. Избор референци је актуелан и примерен тематици која је предмет ове дисертације.

Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Pavlović N, Stanimirov B, Mikov M. Bile acids as novel pharmacological agents: the interplay between gene polymorphisms, epigenetic Factors and drug response. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(1): 187-215. (M21)

Pavlović N, Stankov K, Mikov M. Probiotics - interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 168(7): 1880-95. (M22)

Stankov K, Pavlović N, Mikov M. Epigenetic therapy of cancer. *HOPH.* 2014; 1(2): 83-92. (M53)

Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life Sci.* 2013; 7(3-4):112-22. (M21)

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Након спроведених испитивања и анализе добијених резултата, могу се донети следећи закључци:

- Хидрофилна жучна киселина УДХ испољава антиапоптотски ефекат у јетри и интестинуму експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом, који остварује смањењем односа експресије *Bax* и *Bcl2* гена, као и смањењем експресије гена за тумор супресор p53.
- Полусинтетска жучна киселина МКХ у дози од 4 mg/kg испољава антиапоптотски ефекат у јетри експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом, односно спречава митохондријални пут активације апоптозе у јетри смањењем односа експресије *Bax* и *Bcl2* гена.
- УДХ и МКХ у дози од 4 mg/kg значајно модулирају експресију гена укључених у антиоксидативну заштиту у јетри и интестинуму експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом ка нивоу експресије код здравих, нетретираних животиња.
- УДХ и МКХ у обе примењене дозе значајно модулирају активност антиоксидативних ензима у јетри и интестинуму експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом ка нивоу активности код здравих, нетретираних животиња.
- УДХ и МКХ у дози од 4 mg/kg испољавају антиинфламаторно дејство у јетри и интестинуму експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом смањењем експресије гена за проинфламаторни транскрипциони фактор NF-κB, док ХДХ и МКХ у дози од 20 mg/kg испољавају супротан ефекат додатним повећањем експресије гена за NF-κB, у односу на нетретираних животиња са холестазаом.
- УДХ испољава антиинфламаторно дејство и смањењем експресије гена за индуцибилну азот оксид синтазу (iNOS) у јетри експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом.
- ХДХ и МКХ у дози од 20 mg/kg значајно повећавају експресију гена за нуклеарне рецепторе FXR и SHP у јетри и интестинуму експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом, што указује да ове жучне киселине могу да активирају FXR.
- Жучне киселине испољавају различите ефекте према експресији гена за хистон деацетилазе HDAC1 и HDAC2, а утврђена је и ткивна специфичност код експерименталних животиња са индукованом интрахепатичном холестазаом. Једино УДХ значајно смањује експресију гена за оба испитивана ензима и у јетри и интестинуму.
- Полусинтетски кето дериват жучних киселина МКХ испољава значајно мању цитотоксичност у односу на ХДХ и нешто већу цитотоксичност у односу на УДХ према HT-29 ћелијској линији аденокарцинома колона.
- Епигенетски агенс вориностат испољава синергистичко цитотоксично дејство са све три испитиване жучне киселине, као и са цитотоксичним леком доксорубицином, али и са нетоксичним антиоксидансима N-ацетил цистеином и α-токоферолом.
- Вориностат значајно смањује антиоксидативни капацитет HT-29 ћелија аденокарцинома колона смањењем експресије *NRF2* гена и следственим смањењем експресије гена за антиоксидативне ензиме. ХДХ додатно смањује експресију *NRF2* гена, док МКХ побољшава антиоксидативни капацитет HT-29 ћелија повећањем експресије *NRF2* гена ка вредностима експресије у нетретираним ћелијама.
- Жучне киселине у комбинацији са епигенетским леком вориностатом не испољавају значајан утицај на активност антиоксидативних ензима у HT-29 ћелијској линији аденокарцинома колона.
- Вориностат испољава проапоптотски и антипролиферативни ефекат у HT-29 ћелијама карцинома колона, који су још израженији у комбинацији са МКХ, с обзиром да долази до значајног повећања односа експресије *BAX* и *BCL2* гена и смањења експресије гена за маркер пролиферације циклин D1.
- Све три испитиване жучне киселине негативно регулишу експресију гена за проинфламаторни и антиапоптотски фактор NF-κB у HT-29 ћелијама аденокарцинома

колоне.

- МКХ значајно повећава експресију гена за FXR и SHP у HT-29 ћелијској линији аденокарцинома колоне, што указује да МКХ може да активира FXR рецептор у овим малигним ћелијама.
- Све три испитиване жучне киселине значајно смањују експресију гена за хистон деацетилазе HDAC1 и HDAC2 у HT-29 ћелијама карцинома колоне, што указује да жучне киселине део својих ефеката остварују епигенетским механизмима.

Резултати рада указују да би се, поред хидрофилне природне жучне киселине УДХ, полусинтетски кето дериват МКХ могао користити у хемопревенцији карцинома колоне у ниским дозама, с обзиром на утврђене ефекте у модулацији експресије гена укључених у процесе апоптозе, оксидативног стреса и инфламације. Такође, доказан је синергистички ефекат жучних киселина са епигенетским антитуморским агенсом вориностатом, што отвара могућност комбиноване фармаколошке стратегије у терапији солидних тумора, који у највећем проценту показују резистенцију према самом вориностату. Ова студија је утврдила утицај жучних киселина на експресију гена за HDAC, а савремена сазнања о улози жучних киселина у епигенетској регулацији ћелијских процеса су на ниском нивоу. Стога, резултати ове дисертације пружају и добру основу за даља испитивања у погледу утицаја жучних киселина на друге хроматинске модификације или на метилацију ДНК, чиме би спектар фармаколошких дејстава жучних киселина био проширен у будућности.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат Небојша Павловић је показао систематичан научно-истраживачки приступ анализи великог броја добијених резултата. Резултати истраживања у односу на постављене циљеве приказани су систематично, детаљно су обрађени и критички продискутовани. Графички прикази и табеле доприносе прегледности резултата. Подаци добијени у току истраживања обрађени су и анализирани помоћу адекватних статистичких тестова. Добијени резултати су јасно тумачени на основу најновијих доступних научних сазнања, на прикладан начин анализирани и логички повезани са литературним наводима.

Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Докторска дисертација је написана у потпуности у складу са предложеним испитивањима и образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Докторска дисертација садржи све битне елементе оригиналног научног рада на основу којих би се истраживање могло поновити. Рад је написан концизно и разумљиво, и резултат је самосталног истраживања кандидата.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Докторска дисертација даје оригиналан научни допринос из области фармакологије жучних киселина, превасходно са аспекта потенцијалне примене ових једињења у хемопревенцији и терапији карцинома колоне. Према расположивим подацима ово истраживање је јединствено и оригинално у свеобухватном приступу компаративног испитивања полусинтетског деривата жучних киселина 12-монокетохолне киселине и природних жучних киселина урсоеоксихолне и хенодеоксихолне киселине на процесе апоптозе, оксидативног стреса и инфламације у јетри и интестинуму применом *in vivo* модела интрахепатичне холестазе код експерименталних животиња. Осим тога, испитани су *in vitro* ефекти ових жучних киселина на процесе апоптозе и оксидативног стреса у HT-

<p>29 ћелијама хуманог аденокарцинома колона. Савремена сазнања о улози жучних киселина у епигенетској регулацији ћелијских процеса од значаја за развој и терапију карцинома су на ниском нивоу, а резултати ове дисертације су утврдили утицај жучних киселина на експресију гена за хистон деацетилазе у <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> системима. Поред тога, доказан је синергистички ефекат жучних киселина са епигенетским антитуморским агенсом вориностатом, што отвара могућност комбиноване фармаколошке стратегије у терапији солидних тумора, који у највећем проценту показују резистенцију према самом вориностату. Резултати ове докторске дисертације дају оригиналан научни допринос и са аспекта пружања добре полазне основе за даља испитивања утицаја жучних киселина на друге хроматинске модификације или на процес метилације ДНК, чиме би спектар фармаколошких дејстава жучних киселина у будућности могао да буде значајно проширен.</p>
<p>4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања</p> <p>Докторска дисертација не садржи формалне нити суштинске недостатке који би могли утицати на резултате истраживања.</p>
<p>X ПРЕДЛОГ:</p>
<p>На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:</p>
<p>- да се докторска дисертација под називом "Улога жучних киселина у епигенетској регулацији оксидативног стреса и апоптозе у нормалним и малигним ћелијама" прихвати, а кандидату Небојши Павловићу одобри одбрана</p>

датум: 25.09.2017.

Чланови Комисије

Проф. др Момир Миков
- председник комисије -

Доц. др Светлана Голочорбин-Кон
- члан комисије -

Проф. др Силва Добрић
- члан комисије -

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.