

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРЕДМЕТ:

ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 24.06.2015. године, одлуком 01-6526/3-6 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деканоничне киселине**“ кандидата Душана Михајловића у следећем саставу:

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска биохемија, члан
3. **Проф. др Драгана Вучевић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Душана Михајловића и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

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

Докторска дисертација кандидата Душана Михајловића под називом „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине“, представља оригиналну студију која се бавила испитивањем антиоксидативне способности 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине (10-HDA), најзаступљеније и јединствене масне киселине из матичног млеча, као и њеног ефекта на имунски одговор хуманих ћелија *in vitro*.

Ово истраживање показује да 10-HDA испољава дозно-зависан ефекат на функцију хуманих неутрофила и мононуклеарних ћелија из периферне крви (PBMNC), као и дендритских ћелија моноцитног порекла (MoDC) *in vitro*, при чему у високим концентрацијама делује инхибиторно, а у мањим благо стимулаторно. Такође, 10-HDA у опсегу имуносупресивних концентрација испољава антиоксидативно дејство.

Матични млеч је вискозна, желатиозна супстанца млечно-беле боје коју пчеле радилице (лат. *Apis mellifera*) продукују у хипофарингеалним и мандибуларним жлездама и користе за храњење матице и њених ларви. Због свог благотворног дејства на људски организам матични млеч се вековима користи у традиционалној медицини. Свеж матични млеч чине вода, протеини, угљени хидрати, липиди, минералне соли и витамини. Због тога последњих деценија расте интересовање међу истраживачима да установе које су супстанце матичног млеча биолошки и фармаколошки активне и открију како оне делују самостално. Тако су имуномодулаторна, антиалергијска и антиоксидативна само неке од активности које се приписују протеинској компоненти матичног млеча. Поред протеинског, претпоставља се да и липидни део испољава различите биолошке и фармаколошке ефекте, што није довољно истражено.

Липиде матичног млеча највећим делом чине масне киселине, углавном у слободној форми, а ређе у облику естера. Слободне масне киселине су најчешће средњеланчане (8-12

С атома), а најзаступљенија је 10-хидрокси-2-деcanoична киселина (10-HDA) са уделом од око 70% у укупној липидној фракцији матичног млеча. 10-HDA је до сада пронађена само у матичном млечу, нема је чак ни у другим пчелињим производима, па се може сматрати јединственом за матични млеч. Због тога је њено испитивање заинтересовало бројне истраживаче који су показали да ова масна киселина испољава различите биолошке активности као што су: естрогенска, антитуморска, епигенетска, неурогена, проколагена, антибактеријска и тд. Иако први научни радови о овој масној киселини датирају још из педесетих година прошлог века, мало се зна о њеној имуномодулаторној и антиоксидативној активности. Досадашња истраживања углавном на животињским ћелијским линијама су показала њено анти-инфламаторно својство. Три новије студије на мишјој макрофагној ћелијској линији (RAW264) су потврдиле да 10-HDA инхибира продукцију азот оксида, као и IL-6 и TNF- α . Такође је показано да 10-HDA супримира продукцију матриксних металопроотеиназа 1 и 3 у фибробластима изолованим од пацијената са реуматоидним артритисом. Истраживања спроведена у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије су показала да водени екстракт матичног млеча и 10-HDA имају имуномодулаторна својства на ћелијама пацова. С друге стране, литературни подаци о антиоксидативном деловању 10-HDA су веома оскудни. Наиме, постоји само једна *in vitro* студија у којој је приказано да ова масна киселина смањује степен оксидативног стреса индукованог ултравиолетним А у хуманим дермалним фибробластима, али механизам укључен у овај процес није истражен.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе која је прикупљена детаљним претраживањем електронских база података “Medline”, “PubMed” и “Google Scholar” коришћењем следећих кључних речи: “10-hydroxy-2-decenoic acid”, “fatty acids”, “royal jelly”, “neutrophils”, “peripheral blood mononuclear cells”, “monocyte-derived dendritic cells”, “antioxidative activity” утврђено је да до сада није спроведено слично истраживање у коме је проучаван ефекат 10-HDA на функцију хуманих неутрофила и PBMNC, као и на MoDC. На основу тога Комисија

закључује да докторска дисертација кандидата Душана Михајловића под називом „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине“ представља резултат оригиналног научног рада, који указује да 10-HDA може да модулира имунски одговор хуманих ћелија *in vitro* и испољава антиоксидативно дејство.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Душан Михајловић је рођен 30. априла 1983. године. На Медицинском факултету у Нишу дипломирао је 2010. године са просечном оценом 9,43 и тиме стекао звање доктора медицине. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина, подподручје Имунологија, инфламација и инфекција, је уписао 2010. године, а усмени докторски испит положио је 24.04.2013. године са оценом 10 (десет). Од октобра 2010. године ангажован је као сарадник у настави на предмету Медицинска биохемија на Медицинском факултету Војномедицинске академије (ВМА), Универзитета одбране у Београду. Активно се бави научноистраживачким радом на Институту за медицинска истраживања ВМА. Сарадник је на пројекту ВМА под називом: „Регулаторни механизми у запаљенским и имунским реакцијама“ (МФВМА/4/12-15).

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Кандидат Душан Михајловић, остварио је 37 бодова по основу радова објављених у целини у међународним часописима, бодованих према члану 177. Статута Факултета.

Научни радови објављени у целини:

1. **Mihajlovic D**, Rajkovic I, Chinou I, Colic M. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Functional Foods* 2013;5:838-846. **M21**
2. **Mihajlovic D**, Vucevic D, Chinou I, Colic M. Royal jelly fatty acids modulate proliferation and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur Food Res Technol* 2014;238:881–887. **M22**

3. Čolić M, **Mihajlović D**, Mathew A, Naseri N, Kokol V. Citocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 2015;22:763-778. **M21**
4. Thorne A, Tomić S, Pavlović B, **Mihajlović D**, Džopalić T, Čolić M. Tumour necrosis factor- α promotes survival and phenotypic maturation of Poly (I:C)-treated dendritic cells, but impairs their Th1- and Th17 polarizing capability. *Cytotherapy* 2015;17:633-646. **M21**
5. Zivancevic-Simonovic S, Mihaljevic O, Majstorovic I, Popovic S, Markovic S, Milosevic-Djordjevic O, Jovanovic Z, Mijatovic-Teodorovic L, **Mihajlovic D**, Colic M. Cytokine production in patients with papillary thyroid cancer and associated autoimmune Hashimoto thyroiditis. *Cancer Immunol Immunother* 2015. DOI: 10.1007/s00262-015-1705-5. **M21**

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и спроведеног истраживања се поклапају. Циљеви и методологија истраживања одобрени у пријави докторске дисертације су у највећој мери остали исти.

Докторска дисертација кандидата Душана Михајловића под називом „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине“, је написана на 145 страна и садржи сва неопходна поглавља: Увод, Хипотезе и циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература. Рад садржи 35 графикона, 6 табела и 5 слика, а у поглављу Литература је цитирано 324 библиографских јединица.

У уводном делу кандидат је свеобухватно, јасно и прецизно, користећи најновије податке из литературе изложио актуелна сазнања о испитиваној теми. Кроз неколико поглавља приказани су најважнији и најактуелнији подаци о матичном млечу и његовим антиоксидативним и имуномодулаторним својствима, као и биолошким и фармаколошким активностима 10-HDA. Кандидат је, такође, описао најважније физиолошке улоге неутрофила и дендритских ћелија излажући податке из најновијих ревијских радова водећих светских часописа

У другом поглављу јасно су изложени циљеви и конкретни задаци истраживања: Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на оксидативни прасак хуманих неутрофила периферне крви стимулираних фобол-12-миристан-13-ацетатом (РМА), N-формил-L-метионил-L-леуцил-L-фенилаланином (fMLP) или опсонизованим зимозаном (орZу); Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на спонтану и РМА, fMLP и орZу индуковану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви; Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на процес NEToze хуманих неутрофила периферне крви стимулираних РМА; Испитати способност 10-HDA да „хвата“, односно реагује са реактивним кисеоничним врстама користећи системе без ћелија; Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на пролиферацију PBMNC стимулираних фитохемаглутинином (РНА); Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на продукцију проинфламаторних цитокина у култури PBMNC стимулираних РНА; Испитати ефекат 10-HDA на поларизацију Th имунског одговора у култури PBMNC стимулираних РНА; Испитати утицај различитих концентрација 10-HDA на матурацију и алостимулаторну способност MoDC; Испитати дозно-зависан ефекат 10-HDA на поларизацију Th имунског одговора у ко-култури MoDC и алогених CD4⁺ Т лимфоцита.

Материјал и методологија рада су презентовани на одговарајући начин, веома прецизно и у највећој мери се слажу са наведеном у пријави дисертације. Детаљно су описане све методе коришћене у истраживању: припремање свих коришћених медијума и реагенса, изолација неутрофила и PBMNC, добијање дендритских ћелија из моноцита периферне крви, изолација CD4⁺ Т лимфоцита из PBMNC методом магнетног сортирања, мерење апоптозе коришћењем раствора Түрк-а, пропидијум јодида и annexin V alexa 488, цитофлуориметријска анализа фенотипских карактеристика ћелија применом коњугованих моноклонских антитела, мерење пролиферације ћелија коришћењем радиоактивног тимидина, мерење интензитета оксидативног праска неутрофила хемилуминисценцијом, колориметријски и флуориметријски, одређивање концентрације продукованих цитокина ELISA методом, мерење интензитета NEToze флуориметријском методом, испитивање способности сакупљања реактивних кисеоничних врста у системима без ћелија и мерење интрацелуларне концентрације глутатиона спектрофотометријски. Статистичка обрада

података је адекватно и правилно урађена коришћењем програма GraphPadPrism 5, а вредности су сматране статистички значајним уколико је $p < 0.05$.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани графиконима и сликама. У раду је показано да 10-HDA у високим концентрацијама (500 μ M-2mM) испољава, дозно зависан, инхибиторни ефекат на функције хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA, fMLP и opZu, хуманих PBMNC стимулираних PNA и MoDC стимулираних LPS. Такође, ова масна киселина у високим, милимоларним концентрацијама (1mM-2mM), има антиоксидативно дејство. Међутим, у ниским концентрацијама (50 μ M) 10-HDA испољава благу имуностимулаторну активност.

У поглављу Дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са доступним литературним подацима. Објашњења и коментари добијених резултата су свеобухватни, веома прегледни и разумљиви и проистичу из најважнијих оригиналних и ревијских научних радова који обрађују ову тему. На крају поглавља, кандидат се посебно осврнуо на потенцијалне механизме деловања 10-HDA користећи најновије литературне податке и повезујући сазнања из више научних области.

Литература је у потпуности адекватна по обиму и садржају. Наведене су најзначајније студије у овој области, како оригинални радови тако и прегледни чланци.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

На основу најважнијих резултата истраживања закључено је да:

A) 10-HDA у високим концентрацијама

- смањује степен оксидативног праска хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA, fMLP и opZu
- одлаже како спонтану, тако и PMA, fMLP и opZu индуковану апоптозу хуманих неутрофила периферне крви
- испољава инхибиторни ефекат на NETozu хуманих неутрофила периферне крви стимулираних PMA
- испољава антиоксидативно дејство путем способности да неутралише и реагује са супероксидним анионом и HOCl

- инхибира пролиферацију хуманих PBMNC стимулираних РНА
- смањује продукцију проинфламаторних цитокина, IL-1 β и TNF- α , у култури PBMNC стимулираних РНА
- инхибира матурацију и алостимулаторну способност MoDC стимулираних LPS, као и продукцију IL-12, IL-18 и TNF- α од стране ових ћелија
- супримира Th1 и Th2 имунски одговор у ко-култури MoDC и CD4⁺ Т лимфоцита и у култури PBMNC стимулираних РНА

Б) у ниској концентрацији испољава благо имуностимулаторно дејство подстичући Th1, а истовремено инхибирајући Th2 имунски одговор

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати овог истраживања би могли бити основа за израду нових лековитих препарата, као и за проширење индикација постојећих лекова. Поред тога, научно је поткрепљено вишевековно веровање у благотворно дејство матичног млека и његових компоненти и доказано да матични млек припада „функционалној храни“ Такође, ако се 10-HDA не посматра само као компонента матичног млека већ и као средњеланчана масна киселина са 10 C атома, значај ове студије је још већи будући да се веома мало зна о утицају средњеланчаних масних киселина на имунски систем људи. У овој студији је по први пут показана антиоксидативна активност 10-HDA. Стога би резултати овог истраживања били веома добра полазна тачка за испитивање могућих антиоксидативних и имуномодулаторних особина других масних киселина различитог порекла.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Из дела истраживања ове докторске тезе објављена су два рада у часописима међународног значаја категорије M21 и M22.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Душана Михајловића под називом „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине“ на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Душана Михајловића урађена под менторством академика проф. др Миодрага Чолића, представља оригинални научни рад и има велики научни и практични значај у сагледавању имуномодулаторног и антиоксидативног деловања не само 10-HDA, већ и других средњеланчаних масних киселина са сличном структуром, као и самог матичног млеча.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Имуномодулаторна и антиоксидативна својства 10-хидрокси-2-деcanoичне киселине“, кандидата Душана Михајловића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

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

Проф. др Драгана Вучевић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

У Крагујевцу, 06.07.2015. год.