

Биолошки факултет
Број захтева: 15/705-1
Датум: 14.11.2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Бранка С. Колунџија**

студент докторских студија на студијском програму Молекуларна биологија, Молекуларна биологија еукариота

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*“

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 24.04.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1919/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*“

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 12.09.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/579-12.09.2014. год. у саставу:

| | Име и презиме члана комисије | звање | научна област | Установа у којој је запослен |
|----|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|---|
| 1. | др Татјане Станојковић | научни сарадник | експериментална онкологија | Институт за онкологију и радиологију Србије |
| 2. | др Душанка Савић- Павићевић | ванредни професор | молекуларна биологија | Универзитет у Београду- Биолошки факултет |
| 3. | др Милан Јоксовић | ванредни професор | медицинска хемија | Универзитет у Крагујевцу- Математички факултет |

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 14. новембра 2014. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

- Прилог:**
1. Реферат комисије са предлогом.
 2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата
 3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.
 4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/705-14.11.2014.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на II редовној седници одржаној 14.11.2014. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Бранке С. Колунџије, под називом:

„Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*“

Универзитет је дана 27.03.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-1919/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. Kolundžija B, Marković V, Stanojković T, Joksović L, Matić I, Todorović N, Nikolić M, Joksović MD. **Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity.** [Bioorg Med Chem Lett.](#) 2014; 24(1):65-71. (M₂₂, IF 2.33)

2. Marković V, Janičijević A, Stanojković T, Kolundžija B, Sladić D, Vujčić M, Janović B, Joksović L, Djurdjević PT, Todorović N, Trifunović S, Joksović MD. **Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group.** Eur J Med Chem. 2013;64:228-38.(M₂₁, IF 3.432)

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.09.2014. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Душанке Савић-Павићевић и др Татјане Станојковић о урађеној докторској дисертацији Бранке С. Колунције, истраживача-сарадника Института за онкологију и радиологију Србије, под насловом **„Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*“** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Душанка Савић-Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, ментор, др Татјана Станојковић, научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије, ментор и др Милан Јоксовић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Бранке С. Колунције под насловом **„Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*“** је написана на 125 страница и садржи 35 слика и 5 табела. Текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (32 стране), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (17 страна), Резултати (33 стране), Дискусија (17 страна), Закључак (2 стране) и Литература (21 страна). Дисертација садржи и насловну страну на српском и енглеском језику, страну са информацијама о менторима и члановима комисије, изјаве захвалности, стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (наслов, резиме и кључне речи), као и садржај.

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** докторске дисертације описане су основне карактеристике малигну хелија, које су од значаја за развој хемотерапеутика. Назначено је да је изучавање комплексних молекуларних механизма канцерогенезе кључно не само за разумевање ове групе обољења, већ и за развој побољшаних терапија које ће бити ефикасније и мање токсичне у односу на постојеће. Представљене су различите групе хемотерапеутика, и њихови механизми дејства, као што су цитотоксични хемотерапеутици, хормонска терапија и циљана терапија. Описани су проблеми који се јављају у развоју антитуморских лекова, који пре свега обухватају изузетну токсичност хемотерапеутика и појаву стечене резистенције на примењене лекове. Даље је приказана група антрахинона, са посебним освртом на широк спектар молекуларних механизма дејства ове групе природних и синтетичких једињења. Посебно је издвојена група антрациклинских антибиотика, који се већ дуго са великим успехом, али и озбиљним последицама, примењују у клиничкој пракси. Такође, описан је велики терапеутски потенцијал тиосемикарбазона и халкона и њихови могући механизми дејства.

Поглавље **Циљеви истраживања** доноси приказ основних циљева докторске дисертације. Први циљ обухватио је одређивање интензитета цитотоксичног дејства групе од тринаест једињења дизајнираних, синтетисаних и окарактерисаних на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, од којих девет припадају антрахинонским тиосемикарбазонима, а четири антрахинонским халконима, према низу хуманих малигну хелијских линија, као и одређивање селективности на нивоу цитотоксичног дејства на успостављеним линијама нормалних хуманих хелија. Тип хелијске смрти малигну хелија третираних дериватима антрахинона испитиван је морфолошким анализама, односно бојењем флуоресцентним бојама. Да би се расветлили молекуларни механизми дејства испитиваних новосинтетисаних деривата антрахинона, и њихов анти-пролиферативни и проапоптотски потенцијал, анализирана је дистрибуција хелија по фазама хелијског циклуса након дејства испитиваних једињења. Веома битно за једињења која ће потенцијално бити даље развијана за примену у клиничкој пракси је

и утврђивање сигналног пута преко којег индукују апоптозу, због чега су одређиване циљне каспазе. Један од циљева је било и испитивање потенцијала новосинтетисаних деривата антрахинона да спрече формирање метастаза, односно одређивањем степена активности матриксних металопроотеиназа, након третмана HeLa ћелија испитиваним супстанцама. Такође, анализиран је и потенцијал испитиваних супстанци да спрече неоангиогенезу, као и инвазивност и способност миграције малигних ћелија.

Поглавље **Материјал и методе** укратко описује експерименталне процедуре свих метода коришћених приликом израде ове докторске дисертације, као и порекло свих супстанци и материјала. Коришћене методе обухватају колориметријски МТТ (*Microculture Tetrazolium Test*), акридин оранж/етидијум бромид бојење, анализу фаза ћелијског циклуса уз помоћ проточне цитофлуориметрије, одређивање циљних каспаза преко којих испитивана једињења остварују свој ефекат, као и *Tube formation assay* и *Scratch* или *Wound-healing assay*. У првом делу овог поглавља кратко је описан поступак хемијске синтезе испитиваних једињења, и табеларно су приказане структуре и хемијски називи једињења. Даље су описане ћелијске линије коришћене у експериментима, као и поступак њиховог одржавања и третмана. Такође, детаљно је представљен и колориметријски МТТ тест, којим је анализирано антитуморско дејство тринаест деривата антрахинона, и то према HeLa (аденокарцином цервикса), MDA-MB-361 и MDA-MB-453 (карциноми дојке), K562 (мијелоидна леукемија), A549 (аденокарцином плућа), и LS174 (аденокарцином колона) ћелијским линијама. Представљено је и на који начин је одређивана селективност испитиваних једињења, за шта су коришћене MRC5 ћелије, пореклом из ткива плућа хуманог фетуса. Тип ћелијске смрти (апоптоза и/или некроза) коју индукују испитиване супстанце при вишим концентрацијама дефинисан је на основу анализе морфолошких промена третираних HeLa ћелија бојењем смешом акридин оранжа и етидијум бромида. Проточном цитофлуориметријом, након бојења пропидијум јодидом, су испитани механизми којима деривати антрахинона делују на циљне ћелије. Расветљавање сигналног пута којим екстракти индукују апоптозу у циљним ћелијама вршено је применом специфичних инхибитора каспаза: Z-DEVD-FMK (инхибитор каспазе 3), Z-IETD-FMK (инхибитор каспазе 8) и Z-LEHD-FMK (инхибитор каспазе 9), а затим су

узорци инкубирани са пропиридијум јодидом и анализирани на проточном цитофлуориметру. Метода избора за утврђивање антиметастатског потенцијала испитиваних једињења је желатинска зимографија, при чему су супернатанти скупљани након третмана малигну хелија једињењима, и анализирани на поликриламидном гелу са додатком желатина. Бојењем се визуализовала активност матриксних протеиназа као појава светлијих трака на тамно обојеном гелу. *Tube formation assay*-ом је одређиван анти-ангиогенетски потенцијал испитиваних једињења. Овај експеримент вршен је праћењем формирања тубуларних структура код хелија засејаних на матригел (смешу протеина базалне мембране) и третираних испитиваним супстанцама, у односу на нетретирану контролу. *Scratch* или *Wound-healing* тестом испитиван је утицај супстанци на миграцију циљних EA.hy926 хелија, трансформисаних ендотелијалних хелија умбиликалне вене.

У поглављу **Резултати** у седам целина представљени су резултати добијени овим истраживањем. У првом одељку су приказани резултати добијени колориметријским МТТ тестом, цитотоксична активност испитиваних једињења појединачно према свакој од коришћених малигну и нормалних хелијских линија, а затим сви резултати табеларно, као и резултати провере селективности једињења. Истакнуто је да су најосетљивије K562 хелије мијелоидне леукемије, док су највећу резистенцију показале хелије пореклом из метастатских места канцера дојке. Морфолошком анализом типа хелијске смрти које изазивају испитивана једињења је показано да сва она на мањим концентрацијама доводе до индукције апоптозе, док три испитиване супстанце при већим концентрацијама могу изазвати и некрозу циљних хелија. У трећем делу су приказани резултати анализе дистрибуције хелија шест малигну и једне нормалне хелијске линије након третмана испитиваним антрахинонским дериватима. Показано је да ова једињења имају дозно и временски завистан ефекат на све испитиване хелије. Углавном највећи број тестираних једињења доводи до повећања процента хелија у субG1 фази хелијског циклуса. Наредни одељак доноси приказ ефекта специфичних инхибитора каспаза на проценат HeLa хелија у субG1 фази након дејства тестираних супстанци. Приказани резултати указују на то да већина испитиваних једињења делује путем активације и спољашњег

и унутрашњег апоптотског пута, осим једног једињења код којег примена ниједног инхибитора не доводи до значајног смањења броја ћелија у субГ1 фази, и једног једињења, код којег само инхибитор каспазе-8 доводи до смањења процента ћелија у субГ1 фази. У петом делу Резултата су приказани резултати желатинске зимографије, на којима је убедљиво показано да испитиване супстанце доводе до смањења активности ММП-2 протеаза. Следећи одељак доноси преглед резултата испитивања потенцијала једињења да спрече *in vitro* ангиогенезу EA.hy926 ћелија. Изражену антиангиогенетску активност су показало једно једињење из групе антрахинонских тиосемикарбазона, као и једно једињење из групе халконских антрахинона. Последње, седмо поглавље садржи приказ резултата *Wound healing assay*-а, односно резултате ефекта испитиваних једињења на миграцију EA.hy926 ћелија. Приметно је да већина испитиваних једињења показује знатно већи утицај на смањење потенцијала миграције ових ћелија, у односу на цисплатину и доксорубицин, супстанце које се низ година примењују у клиничкој пракси. Најбоље дејство показало је једно једињење из групе антрахинонских халкона.

У поглављу **Дискусија** представљена је детаљна анализа и интерпретација резултата добијених овим истраживањем. Добијени подаци представљају потпуно нова сазнања о интензитету и механизмима антитуморске активности тестираних деривата антрахинона. Анализиран је однос структуре ових једињења и њихове активности и показаних механизма дејства, што пружа основу за даљи развој хемотерапеутика из ове групе једињења на основу претпостављене активности одређених фармакофора и њиховом даљом комбинацијом. Наведено је да је група антрахинонских халкона показала најизраженије дејство у испитивањима, што се слаже са подацима из литературе. Највећу активност су показала једињења са халогеним супституентима, који се дакле могу сматрати најбитнијим за њихово дејство. У групи антрахинонских тиосемикарбазона посебно се истичу једињења 1 и 3, од којих једињење 1, са фенил супституентом на тиоамидном делу молекула, има веома изражену цитотоксичну активност, али се показало слабије активним у другим експериментима, док једињење 3, иако мање цитотоксично, показује изузетну

селективност, као и инхибиторни ефекат на миграторни и неоангиогенетски потенцијал.

У поглављу **Закључак** кандидат износи преглед најзначајнијих закључака изведених из резултата истраживања извршених у оквиру докторске дисертације. Посебно је истакнуто да једињења из групе антрахинонских халкона генерално имају најбоље дејство на различите аспекте малигног раста, пролиферације и метастатског потенцијала малигних ћелија.

Поглавље **Литература** садржи 209 библиографских јединица које су адекватно цитиране у тексту.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Kolundžija B, Marković V, Stanojković T, Joksović L, Matić I, Todorović N, Nikolić M, Joksović MD. **Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity**. Bioorg Med Chem Lett. 2014; 24(1):65-71. (M₂₂, IF 2.33)

2. Marković V, Janićijević A, Stanojković T, Kolundžija B, Sladić D, Vujčić M, Janović B, Joksović L, Djurdjević PT, Todorović N, Trifunović S, Joksović MD. **Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group**. Eur J Med Chem. 2013;64:228-38.(M₂₁, IF 3.432)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Kolundžija B, Stanojković T, Joksović MD. **Novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group as anti-metastatic and anti-angiogenic agents**. EACR-Anticancer Agents Research Congress (Abstract Book, 2014). (M34)

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Juranić IO, Tošić AV, Kolundžija B, Drakulić BJ. **Antiproliferative activity of the Michael adducts of aroylacrylic acids and cyclic amines**. Mol Divers. 2014; 18(3):577-92. (M₂₁, IF 2.544)
2. Rašković S, Matić IZ, Dordić M, Damjanović A, Kolundžija B, Grozdanić-Stanisavljević N, Besu I, Jovičić Z, Bijelić B, Janković L, Juranić Z. **Immunoreactivity to food antigens in patients with chronic urticaria**. Immunol Invest. 2014; 43(5):504-16. (M₂₃, IF 1.903)
3. Kundaković T, Stanojković T, Kolundžija B, Marković S, Šukilović B, Milenković M, Lakušić B. **Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Satureja montana* subsp. *pisidica* (Lamiaceae)**. Nat Prod Commun. 2013; 7(0). (M₂₂, IF 1.242)
4. Stanojković T, Kolundžija B, Ćirić A, Soković M, Nikolić D, Kundaković T. **Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. (Lamiaceae)**. Dig J Nanomater Bios. 2013; 8: 845-54. (M₂₂, IF 1.200)
5. Matić IZ, Dorđević M, Dordić M, Grozdanić N, Damjanović A, Kolundžija B, Vidović A, Bila J, Ristić S, Mihaljević B, Tomin D, Milanović N, Ristić D, Purić

M, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD. **DPPIV - serum activity and expression on lymphocytes in different hematological malignancies.** Leuk Lymphoma 2013; 54(12):2701-6. (M₂₂, IF 2.605)

6. Vitorović-Todorović MD, Erić-Nikolić A, Kolundžija B, Hamel E, Ristić S, Juranić IO, Drakulić BJ. **(E)-4-Aryl-4-oxo-2-butenic acid amides, chalcone-aroylacrylic acid chimeras: Design, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization.** Eur J Med Chem. 2013; 62C: 40-50. (M₂₁, IF 3.432)
7. Đorđić M, Matić IZ, Filipović-Lješević I, Džodić R, Sašić M, Erić-Nikolić A, Vuletić A, Kolundžija B, Damjanović A, Grozdanić N, Nikolić S, Pralica J, Dobrosavljević D, Rašković S, Andrejević S, Juranić Z. **Immunity to melanin and to tyrosinase in melanoma patients, and in people with vitiligo.** BMC Complementary and Alternative Medicine 2012; 12:109. (M₂₁, IF 2.241)
8. Matić IZ, Đorđić M, Grozdanić N, Damjanović A, Kolundžija B, Erić-Nikolić A, Džodić R, Sašić M, Nikolić S, Dobrosavljević D, Rašković S, Andrejević S, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD. **Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo.** BMC Immunology 2012; 13:48. (M₂₂, IF 3.000)

B3. Kongresna saopšteња na skupovima međunarodnog značaja

1. Kolundžija B, Matić I, Đorđević D, Đorđić M, Damjanović A, Bila J, Ristić S, Mihaljević B, Ristić D, Juranić ZD. **Immunoreactivity to food antigens in patients with plasmacytoma and multiple myeloma.** ECCO (Abstract Book 2013); 616. (M₃₄)
2. Kolundžija B, Drakulić B, Vitorović-Todorović M, Stanojković T, Matić T, Juranić Z. **Antiproliferative (E)-4-aryl-4-oxo-2-butenic Acid Phenylamides, the Chalcone-aroylacrylic Acid Chimera.** European Journal of Cancer Vol. 48, (Supplement 5, 2012), 224. (M₃₄)
3. Matić I., Đorđić M, Grozdanić N, Damjanović A, Kolundžija B, Besu Žižak I, Ristić D, Purić M, Milanović N, Ristić S, Juranić Z. **Imunoreactivity to food antigens and changes in peripheral blood white cells subsets in patients with non-Hodgkin lymphoma.** Immunology Vol. 137 (Suppl. 1, 2012.), 185-772 (M₃₄)
4. Kolundžija B, Vitorović-Todorović M, Stanojković T, Drakulić B, Žižak Ž, Juranić Z. **4-Aryl-2-[1-(4-methylpiperazinyl)]-4-oxobutanoic acids selectively suppress proliferation of human dedifferentiated cells.** EACR-Anticancer Agents Research Congress (Abstract Book, 2011); 93-4. (M₃₄)

B4. Kongresna saopšteња na skupovima domaћeg značaja

1. Kolundžija B, Drakulić B, Vitorović-Todorović M, amjanović A, Đorđić M, Juranić Z. **Cell cycle analyses provides insight nto (E)-4-aryl-4-oxo-2-butenic acid phenylamides mode od action.** 49. ancerološka nedelja, 29. novembra - 1. decembra 2012. godine, Beograd; rogram i zbornik radova, P4. (M₆₄)

2. Damjanović A, Simić M, Savić V, Antić Stanković J, Kolundžija B, Đorđić M, Juranić Z. **The anticancer activity of protoberberine and β -carboline derivatives.** 49. Kancerološka nedelja, 29. novembra - 1. decembra 2012. godine, Beograd; Program i zbornik radova, P1. (M₆₄)
3. Trifunović-Macedoljan J, Pantelić J, Damjanović A, Kolundžija B, Matić I, Đorđić M, Grgurić-Šipka S, Sabo T, Juranić Z. **Anticancer activity of newly synthesized Au(III) complexes.** 49. Kancerološka nedelja, 29. novembra - 1. decembra 2012. godine, Beograd, Program i zbornik radova, 77, P9. (M₆₄)
4. Grozdanić N, Stanojković T, Kljajić Z, Etahiri S, Damjanović A, Kolundžija B, Backović S. **Anticancer activity in vitro of the marine alga laminaria ochroleuca.** 49. Kancerološka nedelja, 29. novembra - 1. decembra 2012. godine, Beograd; Program i zbornik radova, P16. (M₆₄)

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију Бранке С. Колунције закључујемо да је докторска теза написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и да садржи све релевантне елементе. Постављени циљеви истраживања су успешно реализовани, што се види у приказаним резултатима. Докторска дисертација Бранке С. Колунције представља оригинални научни допринос у области експерименталне онкологије. Резултати овог истраживања, који представљају утицај комбиновња фармакофора са већ познатим антитуморским карактеристикама на различите аспекте развоја, пролиферације и метастазирања малигнух ћелија, су по први пут приказани. Експериментални резултати ове докторске дисертације су публиковани у два научна рада, од којих је један рад објављен у врхунском међународном часопису (M₂₁), док је други рад објављен у истакнутом међународном часопису (M₂₂).

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Бранки С. Колунцији** јавну одбрану докторске дисертације под насловом: **„Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*“.**

У Београду, 22.09.2014.

КОМИСИЈА:

др Душанка Савић-Павићевић, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Татјана Станојковић, научни сарадник
Института за онкологију и радиологију Србије

др Милан Јоксовић, ванредни професор
Природно-математичког факултета Универзитета у
Крагујевцу