

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ОДЛУКА ВЕЋА ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ
О ФОРМИРАЊУ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 18.01.2017. године, одлуком бр. IV-03-65/34 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*** ” кандидата магистра фармације Милене Дељанин у следећем саставу:

1. **Проф. др Михајло Јаковљевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник
2. **Проф. Др Снежана Цупара**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан
3. **Др Александра Ристић-Фира**, научни саветник, Институт за нуклеарне науке "Винча", Београд, члан
4. **Проф. др Владислав Воларевић**, ванредни професор 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.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Милене Дељанин 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 *mg ph* Милене Дељанин под називом „Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*”, урађена под менторством Сузане Поповић, научног сарадника Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, представља оригиналну научну студију која се бави испитивањем директног и индиректног антитуморског деловања екстракта биљке *Chelidonium majus in vitro*.

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 малигних 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, као и у третману различитих малигнитета. Широки спектар биолошких активности *C. 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 *C. 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 био 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.

У овом истраживању описано је директно и индиректно антитуморско дејство екстракта *C. majus* на ћелијским линијама хуманог тумора колона, плућа и дојке. Добијени резултати могу 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 и тиме указати на могућност његове примене у одређеним терапијским протоколима. Поред тога, ниски трошкови и једноставност добијања екстракта *C. majus* говоре у прилог оправданости овакве врсте студије.

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

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података „PubMed”, „Medline”, „KOBSON”, „SCIndeks”, помоћу следећих кључних речи: „Chelidonium majus”, „crude extract”, „antitumor activity”, „gamma irradiation“, „radiosensitizer”, „cell migration inhibition” пронађено је пет студија које се баве испитивањем директног цитотоксичног дејства целокупног екстракта *C. majus in vitro* на хуманим ћелијским линијама тумора, али нема података о дејству екстракта на ћелије туморских ћелијских линија НСТ-116, SW480, А549 и Н460, као ни о ефекту екстракта на ћелијски циклус и о сигналним путевима који су укључени у индукцију апоптозе у испитиваним ћелијским линијама. Подаци о инхибиторном дејству екстракта на миграцију ћелија хуманих туморских линија *in vitro* нису пронађени. Такође, није пронађена студија која се бави ефектом удруженог деловања екстракта *C. majus* са конвенционалним начинима онколошког лечења. У литератури не постоје подаци који указују на потенцијалну употребу целокупног екстракта *C. majus* као радиосензитизера.

На основу ових података, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Милене Дељанин под називом „Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*” представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

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 руководилац 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.

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

Кандидат је аутор више оригиналних научних радова и први аутор у раду објављеном у часопису индексираним на SCI листи чији су резултати саставни део докторске дисертације, чиме је испунио услов за одбрану докторске дисертације.

Списак радова у часописима:

1. **Milena Deljanin**, Mladen Nikolic, Dejan Baskic, Danijela Todorovic, Predrag Djurdjevic, Milan Zaric, Milan Stankovic, Milos Todorovic, Dusko Avramovic, Suzana Popovic. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016, 190: 362-371.(ISSN 0378-8741) **M21a**
2. **Milena D. Deljanin**, Mira H. Vuković. Pharmacoepidemiological Analysis of Statins Dispensing Patterns in Pharmacy Practice – Profile and Side Effects. *Hospital Pharmacology-International Multidisciplinary Journal*. 2016, 3(1): 354-360. (ISSN 2334-9492)
3. **Milena Nikolić**, Mladen Nikolić. Effects of atropine sulfate after poisoning with organophosphorus compounds. *Journal of Process Management - New technologies / JPMNT*. January 2013, 1(1): 87-92. (ISSN 2334-735X)

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

Урађена истраживања су у потпуности у складу са пријављеном темом докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија истраживања идентични су са одобреним у пријави тезе.

Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Рад садржи 10 слика, 2 табеле, и 8 графикана.

У поглављу „Литература” цитирано је 270 библиографских јединица.

У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је на свеобухватан, јасан и прецизан начин изложио актуелна сазнања о карактеристикама малигнух ћелија, антинеопластима који се користе у терапији малигнитета и употреби биљака у терапији тумора. Кандидат је такође детаљно описао досадашња сазнања о биолошким дејствима секундарних метаболита изолованих из биљке *C. majus*, као и целокупног екстракта биљке и указао на оправданост даљег испитивања антитуморског дејства екстракта и његове могуће примене као додатне терапије у лечењу канцера.

Циљеви и хипотезе истраживања јасно су изложени и дефинисани у складу са одобреним приликом пријаве тезе. Основни циљеви овог истраживања су да се испитају директно и индиректно антитуморско дејство екстракта *C. majus*. У складу са постављеним циљевима постављени су конкретни задаци:

1. Испитати потенцијалну цитотоксичност екстракта на по две туморске ћелијске линије различитог порекла и степена инвазивности (карцином дојке - MDA-MB-231, MCF7; карцином плућа – A549, H460; карцином колона - HCT116, SW480), као и селективност у његовом дејству у односу на здраве ћелије (фибробласти – MRC-5)
2. Одредити тип ћелијске смрти након излагања ћелија екстракту
3. Утврдити да ли испитивани екстракт зауставља раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса
4. Утврдити да ли испитивани екстракт показује адитивно или синергистичко дејство са цитостатикима
5. Утврдити да ли испитивани екстракт утиче на миграцију малигнух ћелија
6. Утврдити да ли испитивани екстракт утиче на радиосензитивност малигнух ћелија, приликом зрачења ћелија γ -зрацима

Постављена је хипотеза да ће резултати истраживања показати директне и индиректне антитуморске ефекте испитиваног екстракта.

Материјал и методологија рада адекватно су и прецизно формулисани и презентовани у складу са одобреним приликом пријаве тезе. Кандидат је прецизно описао екстракцију биљног материјала. Описане су ћелијске линије које су коришћене у овом истраживању и начин њихове култивације. Прецизно је описан третман ћелија и тестови за испитивање цитотоксичног ефекта екстракта, одређивање типа ћелијске смрти и ефекта на ћелијски циклус третираних ћелија. Дејство екстракта на вијабилност туморских ћелијских линија и фибробласта одређивана је 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама екстракта у односу на нетретиране ћелије применом МТТ теста и SRB теста. Абсорбанца је мерена на читачу Zenith 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria). Тип ћелијске смрти одређиван је анализом морфолошких промена ћелија обојених смешом боја акридин оранж и етидијум бромид помоћу флуоресцентног микроскопа (Polywar, Reinhard Jung) и Canon PC 1089 камере, и методом проточне цитометрије (Cytomics FC500 (Beckman Coulter) коришћењем Annexin V и 7-AAD, анти-Bcl-2, анти-Bax и анти-активна каспаза 3 моноклонских антитела. Анализа ћелијског циклуса извршена је бојењем ћелија пропидијум-јодидом и мерењем на проточном цитометру. Резултати добијени мерењем на проточном цитометру обрађени су помоћу Flowing Software-а (<http://www.flowingsoftware.com/>). Тестом инхибиције миграције испитано је да ли екстракт утиче на миграцију малигних ћелија. За фотографисање је коришћена Canon PC 1089 камера, а слике су анализирани уз помоћ ISCapture Software-а (<http://iscapture.software.informer.com/download/>). Утицај на радиосензитивност малигних ћелија утврђен је излагањем третираних и нетретираних ћелија γ -зрацима (1-4Gy) и одређивањем инхибиције раста помоћу МТТ теста и клоногеног теста. Као извор γ -зрака коришћен је ^{60}Co .

Резултати истраживања су детаљно и јасно приказани помоћу 1 слике, 2 табеле и 8 графикана. Утврђено је да екстракт показује умерену и високу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог тумора колоне (HCT-116 и SW480), плућа (A549 и H460) и дојке (MDA-MB-231 и MCF7), док показују ниску активност на фибробластима (MRC-5). Цитотоксични ефекат је дозно зависан, односно повећање концентрације тестираних комплекса је праћено значајним смањењем вијабилности туморских ћелија. Такође, показано је и синергистичко дејство екстракта са доксорубицином, антинеопластиком који је у широкој употреби у лечењу бројних врста карцинома. Испитивани екстракт је у нетоксичним концентрацијама инхибирао миграцију туморских ћелија дојке (MDA-MB 231), колоне (HCT116) и плућа (A549). Претретман

веома ниским концентрацијама екстракта повећао је осетљивост туморских ћелија на зрачење γ -зрацима.

У поглављу Дискусија, аутор је анализирао добијене резултате и упоређивао их са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су прегледно и јасно изнети те нам пружају нове информације у погледу антитуморске активности целокупног екстракта *Chelidonium majus*.

На основу предходно изнетих чињеница, комисија сматра да завршена докторска дисертација под називом „Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*” по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној и одобреној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Екстракт испољава директно антитуморско дејство *in vitro*:

- Испитивани екстракт *Chelidonium majus* показује временски- и дозно-зависно повећање цитотоксичности свих испитиваних туморских ћелијских линија, уз добру селективност према овим ћелијама у односу на здраве, нетрансформисане ћелије (фибробласте);
- У третираним туморским ћелијским линијама (A549, HCT116 и MDA-MB 231) екстракт у високом проценту индукује апоптозу, што је потврђено и утврђивањем морфолошких промена типичних за апоптозу и одређивањем протеина карактеристичних за овај процес;
- У третираним ћелијама екстракт доводи до застоја у G2/M фази ћелијског циклуса, са пратећим смањењем процента ћелија у G0/G1 фази.
- Дејство екстракта и доксорубицина је синергистичко, а овај ефекат зависи од ћелијске линије на коју се примењује, као и од примењене дозе доксорубицина.

2. Екстракт испољава индиректно антитуморско дејство *in vitro*:

- Екстракт *Chelidonium majus* инхибира миграцију A549, HCT116 и MDA-MB 231 ћелија.
- Екстракт *C. majus* у нетоксичним концентрацијама повећава осетљивост A549, HCT116 и MDA-MB 231 ћелија на γ -зрачење

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом прате токове савремених истраживања у области проналажења нових антитуморских агенаса и њихове примене. Резултати овог истраживања указују на могућу примену екстракта *Chelidonium majus* у терапији канцера, као примарног агенса или као додатне терапије.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати овог истраживања су објављени у часопису индексираном на SCI листи (M21a): **Milena Deljanin**, Mladen Nikolic, Dejan Baskic, Danijela Todorovic, Predrag Djurdjevic, Milan Zaric, Milan Stankovic, Milos Todorovic, Dusko Avramovic, Suzana Popovic. *Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016, 190: 362-371.

Планирано је и да остали резултати овог истраживања буду публиковани у неком од истакнутих часописа од међународног значаја и буду приказани на научним и стручним скуповима у виду усмене презентације.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Милене Дељанин под називом „Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*”, на основу свега наведеног оцењује да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено. Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Милене Дељанин, урађена под менторством научног сарадника др Сузана Поповић, има оригинални научни и практични значај у потрази за ефикасним антитуморским леком.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, да докторска дисертација под називом „Антитуморска активност екстракта *Chelidonium majus in vitro*”, кандидата Милене Дељанин буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

Проф. Др Снежана Цупара, ванредни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан

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

Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор 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, 07.02.2017. године