

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na sednici održanoj 28.12.2017. godine, donelo je **Odluku (broj 2424/2)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „*In vitro* ispitivanje antitumorske i antimikrobne aktivnosti ekstrakata mahonije, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.“, kandidatkinje **dipl. farm. Ane Damjanović**, istraživača saradnika na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Komisija u sastavu:

- 1. Dr sc. Jelena Antić Stanković, redovni profesor, mentor, predsednik komisije,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 2. Dr sc. Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik, mentor,**
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije
- 3. Dr sc. Gordana Zdunić, viši naučni saradnik,**
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Ane Damjanović pod nazivom „***In vitro* ispitivanje antitumorske i antimikrobne aktivnosti ekstrakata mahonije, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.**“ napisana je na 117 strana standardnog formata (prored 1,5; font *Times New Roman* - 12). Doktorska disertacija sadrži **Rezime** na srpskom i engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. Uvod, 2. Ciljevi istraživanja, 3. Materijal i metode, 4. Rezultati, 5. Diskusija, 6. Zaključak, 7. Literatura, 8. Prilozi.**

Disertacija sadrži 19 slika, 14 tabela i 180 literaturnih navoda.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Na osnovu literaturnih podataka postavljena je hipoteza istraživanja, da ekstrakti kore vrste *M. aquifolium* pokazuju antitumorski i/ili antimikrobni efekat.

HPLC-MS metodom analizirani su vodeni i etanolni ekstrakt vrste *M. aquifolium*. Poređenjem retencionog vremena i masenog spektra dobijenog za standardno jedinjenje sa podacima dobijenim za ispitivane ekstrakte utvrđeno je prisustvo berberina, i to u većem procentu u etanolnom (2,4%) nego u vodenom (1,3%) ekstraktu. Detektovano je i prisustvo drugih alkaloida, čija je identifikacija zahtevala dalju hemijsku analizu.

Na osnovu detaljne analize 1D i 2D NMR spektara, kao primarni metaboliti u hloroformskim, etanolnim (ekstrakcija sa 62% etanolom) i frakcionisanim ekstraktima detektovani su šećeri saharoza i glukoza, kao i nezasićene masne kiseline. Kao sekundarni metaboliti NMR spektroskopijom detektovani su protoberberinski alkaloidi (palmatin, berberin i jatrorizin), aporfinski alkaloid (magnoflorin) i bisbenzilizohinolinski alkaloid (berbamin). Takođe, poređenjem NMR spektara ekstrakata koji su pripremani na različite načine uočene su razlike u njihovom sastavu. U hloroformskim i 62% etanolnim ekstraktima kao glavni sastojci detektovani su magnoflorin i protoberberinski alkaloidi. Reekstrakcijom etanolnog ekstrakta hloroformom na pH = 8 dobijena je frakcija u kojoj su berbamin, berberin i palmatin

detektovani kao glavni sastojci. Reekstrakcija je značajno povećala prisustvo tercijarnog, bisbenzilzohinolinskog alkaloida berbamina zahvaljujući njegovim kiselo-baznim osobinama i različitom rastvorljivošću protonovanog i neprotovanog oblika u hloroformu. U cilju korelisanja hemijskog sastava hloroformskih, etanolnih i frakcionisanih ekstrakata sa podacima o njihovoj citotoksičnosti prema HeLa ćelijskoj liniji adenokarcinoma cerviksa, primenjena je metoda multivarijantne analize podataka pod nazivom ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS). Ovim putem, utvrđeno je da najveći doprinos u citotoksičnoj aktivnosti imaju berberin, palmatin i berbamin.

Antiproliferativni efekat ispitan je na nizu humanih malignih ćelijskih linija (HeLa (adenokarcinom cerviksa), LS 174T (adenokarcinom kolona), A549 (adenokarcinom pluća), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), K-562 (mijeloidna leukemija)) pri čemu su oba ispitivana ekstrakta, etanolni i vodeni, pokazala umeren efekat na preživljavanje ćelija. Koncentracije ekstrakata koje su za 50% inhibirale preživljavanje ćelija nakon 72 h tretmana (IC_{50}) kretale su se od $42.91 \pm 2.60 \mu\text{g/ml}$ do $191.98 \pm 1.80 \mu\text{g/ml}$ za vodeni ekstrakt i od $38.96 \pm 9.04 \mu\text{g/ml}$ do $>200 \mu\text{g/ml}$ za etanolni ekstrakt. Slabiji efekat ekstrakti su pokazali prema normalnim ćelijama, koje nisu maligno transformisane (MRC5 (fibroblasti pluća)) čime je dokazana i njihova dobra selektivnost. Dalja ispitivanja tipa ćelijske smrti koju indukuju ekstrakti biljne vrste *M. aquifolium* pokazala su da vodeni i etanolni ekstrakt indukuju prosek apoptoze, dominantno spoljašnjim putem aktivacije. Niz eksperimenata koji je obuhvatao analizu morfoloških promena na tretiranim ćelijama, analizu preraspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, kao i analizu aktivacije ciljnih kaspaza nedvosmisleno je potvrdio da se radi o procesu apoptoze, a kao jedan od mogućih puteva aktivacije detektovan je put dominantno preko kaspaze-9 kod ćelija tretiranih sa vodenim ili etanolnim ekstraktom i u znatno manjoj meri put preko kaspaze-8 kod ćelija tretiranih etanolnim ekstraktom.

Za ispitivanje efekta vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* na procese angiogeneze i migracije korišćena je ćelijska linija EA.hy926. (humane transformisane endotelijalne ćelije umbilikalne vene) (Hanahan i sar., 2011). Dobijeni rezultati su pokazali da oba ekstrakta inhibiraju migraciju ćelija, dok je na suprimiranje procesa angiogeneze znatno više uticao etanolni nego vodeni ekstrakt.

Toksičnost postojeće hemioterapije često je faktor koji ograničava njenu primenu i efikasnost (Thorn i sar., 2011; Carvalho i sar., 2009). Zato je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio da se ispita kombinovano dejstvo ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium* sa nekim od postojećih lekova koji se primenjuju u kliničkoj praksi. U ovom istraživanju odabran je lek doksorubicin, koji se koristi u lečenju različitih maligniteta, a čija je toksičnost izuzetno izražena i izaziva niz neželjenih efekata kod pacijenata koji su na terapiji doksorubicinom (Carvalho i sar., 2009). Za ove eksperimente odabrana je ćelijska linija adenokarcinoma pluća (A549), za koju je dokazano da ispoljava veću rezistenciju na doksorubicin, od drugih maligno transformisanih ćelija, koje su korišćene u ovom istraživanju (Borst i sar., 2000; Salomon i Ehrhardt, 2011; Lee i Lim, 2006; Meschini i sar., 2002). Rezultati su pokazali da vodeni i etanolni ekstrakt u kombinaciji sa doksorubicinom ispoljavaju snažan sinergistički efekat. Vrednosti kombinatornog indeksa (CI) su iznosile od 0.12 do 0.40. Takođe, analizom preraspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa i uvođenjem ćelija u apoptozu, utvrđeno je da se kombinovanim tretmanom ekstrakt/doksorubicin može postići isti efekat pri znatno nižim koncentracijama doksorubicina, kao i sa tretmanom koji čini čist doksorubicin u višim koncentracijama. Ovi rezultati pokazali su da oba ispitana ekstrakta imaju sposobnost da očuvaju dobru efikasnost doksorubicina pri nižim koncentracijama leka *in vitro*, čime bi se potencijalno mogla znatno smanjiti toksičnost i posledično neželjeni efekti izazvani primenom ovog leka u njegovim standardnim koncentracijama. Takođe, pokazano je da ekstrakti povećavaju zadržavanje doksorubicina u ćeliji, posebno etanolni ekstrakt, čime se utiče na potenciranje procesa apoptoze, a smanjuje se i mogućnost za reparaciju oštećenja u malignoj ćeliji koja indukuje ovaj lek. Takođe, dalje istraživanje je pokazalo da kombinovani tretman ekstrakt/doksorubicin u većoj meri inhibira migraciju i formiranje kolonija maligno transformisanih ćelija, nego tretman doksorubicinom. U cilju razjašnjenja mehanizama koji se nalaze u osnovi efekta kombinovanog tretmana analizirana je ekspresija ciljnih gena (*MMP2* i *MMP9* odgovorni su za invazivnost i migraciju tumorskih ćelija; *OCN* i *CTNBN1* odgovorni su za formiranje međućelijskih veza, *ERCC1* odgovoran je za reparaciju genetskog materijala) u ćelijama tretiranim ekstraktima, doksorubicinom ili njihovom kombinacijom. Rezultati, sniženje ekspresije *MMP9* i povećanje ekspresije *OCN* gena pod uticajem kombinovanog tretmana, su pokazali da kombinovani tretman ima efekat

na gene koji su odgovorni za migraciju ćelija i formiranje ćelijskih veza, čime se mogu objasniti prethodno dobijeni rezultati, a ujedno i potvrditi dobar antikancerogeni potencijal.

Antimikrobni efekat vodenog i etanolnog ekstrakta biljne vrste *M. aquifolium* ispitan je na mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*) koji češće izazivaju infekcije kod imunokompromitovanih pacijenata, u koje svakako spadaju i pacijenti sa malignim bolestima. Rezultati su pre svega pokazali da je znatno intenzivniji efekat etanolnog ekstrakta, što je bilo u skladu sa prethodno objavljenim podacima, da su upravo alkaloidi glavni nosioci bioloških funkcija predstavnika roda *Mahonia*. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za etanolni ekstrakt kretale su se od 0.8 mg/ml do 3 mg/ml, dok su za vodeni ekstrakt ove vrednosti bile od 1.6 mg/ml do 6 mg/ml. Najbolji antimikrobni efekat oba ekstrakta pokazala su na bakterijskoj vrsti *S. aureus*. Oba ispitana ekstrakta pokazala su inhibitorni uticaj na proces sinteze faktora virulencije *S. aureus*. Etanolni ekstrakt biljne vrste *M. aquifolium* delovao je inhibitorno na sintezu glikokaliksa intenzivnije od vodenog ekstrakta. Vodeni ekstrakt je pored inhibicije na sam proces sinteze glikokaliksa, pokazao sposobnost i da indukuje morfološke promene u novo formiranim bakterijskim kolonijama tretiranih uzoraka. Oba ekstrakta pokazala su sposobnost da umereno inhibiraju sintezu biofilma, važnog faktora virulencije posebno kod pacijenata koji su na bolničkom lečenju, bakterijskog soja *S. aureus*. Da bi se upotpunila analiza antimikrobnog efekta ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium* bilo je od značaja ispitati zajednički efekat ekstrakata i antibiotika koji su danas u upotrebi. Za ovaj segment eksperimenata odabrani su antibiotici sa različitim mehanizmom delovanja (amoksicilin, cefaleksin, ceftriakson, tetraciklin, eritromicin, gentamicin, hloramfenikol i bacitracin). Takođe, zajednički efekat ekstrakata ispitan je i sa antimikoticima (nistatin i vorikonazol). Rezultati su pokazali da ekstrakti sa gotovo svim antibioticima deluju sinergistički. Isti rezultat dobijen je i pri ispitivanju kombinovanog tretmana ekstrakata i antimikotika. Aditivan efekat zabeležen je u dva slučaja, kod kombinovanog tretmana koji su činili vodeni ekstrakt i amoksicilin i vodeni ekstrakt i bacitracin.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Biljne vrste roda *Mahonia* do danas su zastupljene u tradicionalnoj medicini različitih naroda (He i Mu, 2015). Sve veći broj istraživanja u oblasti onkologije sa ciljem otkrivanja novih agenasa doveo je i do saznanja o antiproliferativnom efektu kako pojedinačnih predstavnika ovog roda (*M. oiwakensis* i *M. balei*), tako i alkaloida tipa berberina, koji se smatraju glavnim nosiocima aktivnosti (Hu i sar., 2011; Wong i sar., 2009). Rezultati ove doktorske disertacije potvrdili su antikancerogeni potencijal predstavnika roda *Mahonia*, uzimajući za predmet istraživanja biljnu vrstu *M. aquifolium*, čija antitumorska svojstva do sada nisu bila ispitana. Osim podataka o antikancerogenom potencijalu predstavnika roda *Mahonia* podatak o antiinflamatornim svojstvima biljke *M. aquifolium* (Gulliver i Donsky, 2005) takođe je bio razlog da se ispituju antitumorski efekti ove vrste. Rezultati ove doktorske disertacije potvrdili su ranije podatke iz literature da većina biljaka sa antiinflamatornim efektom, zbog uloge hroničnog zapaljenja u patogenezi kancera, imaju i antikancerski potencijal (Taylor i sar., 2014; Mantovani i sar., 2008).

Literaturni podaci o citotoksičnoj aktivnosti alkaloida tipa berberina potvrđeni su rezultatima ove doktorske disertacije u okviru ispitivanja antitumorske aktivnosti, i nakon obavljene odgovarajuće hemijske analize (Jabbarzadeh Karboli i sar., 2014; Rahmatullah i sar., 2014; Liu i sar., 2013; Hambright i sar., 2015). Takođe, rezultati dobijeni u okviru ove teze pokazali su da pored berberina, do sada najispitivanijeg alkaloida ovog roda, i alkaloid berbamin predstavlja važnog nosioca citotoksične aktivnosti, i da svakako treba biti predmet daljih istraživanja u ovoj oblasti.

Studije o berberinu pokazale su da ovaj alkaloid, jedan od glavnih sekundarnih metabolita predstavnika roda *Mahonia*, preko različitih signalnih puteva utiče na proces apoptoze (Jabbarzadeh i sar., 2014). Neki od mehanizama delovanja berberina su između ostalih i aktivacija kaspaza 3, 8 i 9 (Ho i sar., 2009; Lin i sar., 2006; Mantena i sar., 2006), a literaturni podaci su pokazali da sekundarni metabolit berbamin indukuje proces apoptoze preko kaspaza 9 i 3 (Rahmatullah i sar., 2014). Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske teze pokazuju smanjenje procenta HeLa ćelija u apoptozi, odnosno subG1 fazi ćelijskog ciklusa, kada su ćelije pretretirane inhibitorima kaspaze 3

i 8 i tretirane ispitivanim vodenim i etanolnim ekstraktom. Pretretman ćelija sa inhibitorom kaspaze 9 doveo je do neznatnog sniženja u subG1 fazi, samo u uzorcima koji su tretirani etanolnim ekstraktom. Ovaj rezultat može se objasniti količinom alkaloida u ispitivanim ekstraktima, odnosno nedovoljnom količinom alkaloida u vodenom ekstraktu, koji bi indukovali apoptozu i preko kaspaze 9. Na osnovu ovih dobijenih rezultata zaključeno je da oba ekstrakta indukuju proces apoptoze u ćeliji pre svega aktivacijom kaspaze 3 i kaspaze 8. Za ostale identifikovane alkaloidne u ekstraktima vrste *M. aquifolium* još uvek ne postoje literaturni podaci o tipu i mehanizmu kojim inhibiraju proliferaciju, što bi svakako trebalo da bude jedan od ciljeva daljeg istraživanja ove biljne vrste.

Do sada nije bilo poznato da li ekstrakti predstavnika roda *Mahonia* mogu uticati na invazivnost, odnosno na migraciju i angiogenezu maligno transformisanih ćelija. U okviru ove doktorske disertacije pokazan je i antimetastatski efekat ekstrakata *M. aquifolium*, a nakon obavljene analize genske ekspresije tretiranih maligno transformisanih ćelija, potvrđeni su raniji literaturni podaci o uticaju alkaloida na formiranje međućelijskih veza i proces migracije (Park i sar., 2012; Albring i sar., 2013; Liu i sar., 2009).

Sinergistički efekat ispitanih ekstrakata sa doksorubicinom je prvi takav podatak, koji ukazuje na potrebu daljih istraživanja i razvoja formulacija biljnih preparata roda *Mahonia* koji bi mogli naći primenu za smanjenje toksičnih efekata standardne terapije. Takođe, ovim rezultatima potvrđen je raniji podatak da berberin smanjuje toksičnost doksorubicina (Zhao i sar., 2011), ali se i sugeriše da ostali u ekstraktima prisutni alkaloidi mogu posedovati sličnu aktivnost, koja treba da bude ispitana.

Poznato je da se biljna vrsta *M. aquifolium* u tradicionalnoj medicini koristila za tretiranje infektivnih bolesti, a rezultati prethodnih istraživanja potvrdili su njen uticaj na preživljavanje mikroorganizama (He i Mu, 2015). Rezultati ove doktorske disertacije takođe su pokazali da ova biljna vrsta inhibira preživljavanje različitih mikroorganizama. Raniji literaturni podaci koji pokazuju da su upravo alkaloidi glavni nosioci antimikrobne aktivnosti, potvrđeni su i rezultatima iz ove teze (Slobodnikova i sar., 2004; Vollekova i sar., 2001; Vollekova i sar., 2004; Cernakova i Kostalova, 2002). Podaci koji su dobijeni u okviru ispitivanja uticaja na virulentnost

mikroorganizama, prvi su takvi podaci o biljnoj vrsti *M. aquifolium*. Takođe, do sada nije bilo podataka o zajedničkom uticaju ekstrakata ove biljne vrste sa antibioticima ili antimikoticima. Sada njihovo dokazano sinergističko dejstvo sugerise da kako sami ekstrakti, tako pojedinačni alkaloidi mogu biti novi agensi u antimikrobnoj terapiji.

CITIRANA LITERATURA:

Albring K.F., Weidemüller J., Mittag S., Weiske J., Friedrich K., Geroni M.C., Lombardi P., Huber O. Berberine acts as a natural inhibitor of Wnt/ β catenin signaling—identification of more active 13-arylalkyl derivatives. *Biofactors*. 2013; 39:652-662.

Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:1295-1302.

Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I., Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect, *Curr Med Chem*. 2009; 16:3267-3285.

Cernáková M, Kostálová D. Antimicrobial activity of berberine--a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2002; 47:375-378.

Gulliver W.P., Donsky H.J. A report on three recent clinical trials using *Mahonia aquifolium* 10% topical cream and a review of the worldwide clinical experience with *Mahonia aquifolium* for the treatment of plaque psoriasis. *Am J Ther*. 2005; 12:398-406.

Hambricht H.G., Batth I.S., Xie J., Ghosh R., Kumar A.P. Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: Potential role for pS6/NF κ B/FLIP. *Mol Carcinog*. 2015; 54:1227-1234.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.

He J.M., Mu Q. The medical uses of the genus *Mahonia* in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:668-683.

Ho Y.T., Lu C.C., Yang J.S., Chiang J.H., Li T.C., Ip S.W. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res.* 2009; 10:4063–4070.

Jabbarzadeh Kaboli P., Rahmat A., Ismail P., Ling K.H. Targets and mechanisms of berberine, a natural drug with potential to treat cancer with Special focus on breast cancer. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740:584-595.

Lee E., Lim S.J. The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines. *Arch Pharm Res.* 2006; 29:1018-1023.

Lin J.P., Yang J.S., Le J.H., Hsieh W.T., Chung J.G. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12:21–28.

Liu J., He C., Zhou K., Wang J., Kang J.X. Coptis extracts enhance the anticancer effect of estrogen receptor antagonists on human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 378:174–178.

Liu R., Cao Z., Pan Y., Zhang G., Yang P., Guo P., Zhou Q. Jatrorrhizine hydrochloride inhibits the proliferation and neovascularization of C8161 metastatic melanoma cells. *Anticancer Drugs.* 2013; 24:667-676.

Mantena S.K., Sharma S.D., Katiyar S.K. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest

and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1-Cdk cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP. *Carcinogenesis*. 2006; 27:2018–2027.

Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454:436–444.

Meschini S., Marra M., Calcabrini A., Monti E., Gariboldi M., Dolfini E., Arancia G. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicol In Vitro*. 2002; 16:389-398.

Park K.S., Kim J., Bae J., Park S.Y., Jee H.G., Lee K.E., Youn Y.K., Berberine inhibited the growth of thyroid cancer cell lines 8505C and TPC1. *Yonsei Med J*. 2012; 53:346-351.

Rahmatullah M., Jahan R., Anwarul Bashar A.B.M., Al-Nahain A., Majumder S., Tabibul Islam M., Rani Das P. A review on berbamine – a potential anticancer drug. *WJPPS*. 2014; 3:95-110.

Salomon J.J., Ehrhardt C. Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011; 77:392-397.

Slobodníková L., Kost'álová D., Labudová D., Kotulová D., Kettmann V. Antimicrobial activity of Mahonia aquifolium crude extract and its major isolated alkaloids. *Phytother Res*. 2004; 18:674-676.

Taylor P., Colman L., Bajoon J. The search for plants with anticancer activity: pitfalls at the early stages. *J Ethnopharmacol*. 2014; 158:246-254.

Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T.E., Altman R.B., Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21:440-446.

Volleková A., Kostálová D., Sochorová R. Isoquinoline alkaloids from *Mahonia aquifolium* stem bark are active against *Malassezia* spp. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46:107-111.

Vollekova, A., Kost'aloova, D., Kettmann, V., Toth, J., 2003. Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* extract and its major protoberberine alkaloids. *Phytother Res*. 2003; 17:834-837.

Wong B.S., Hsiao Y.C., Lin T.W., Chen K.S., Chen P.N., Kuo W.H., Chu S.C., Hsieh Y.S. The in vitro and in vivo apoptotic effects of *Mahonia oiwakensis* on human lung cancer cells. *Chem Biol Interact*. 2009; 180:165-174.

Zhao X., Zhang J., Tong N., Liao X., Wang E., Li Z., Luo Y., Zuo H. Berberine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *J Int Med Res*. 2011; 39:1720-1775.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. Damjanović A, Zdunić G, Šavikin K, Mandić B, Jadranin M, Matić IZ, Stanojković TP. Evaluation of the anti-cancer potential of *Mahonia aquifolium* extracts via apoptosis and anti-angiogenesis. *Bangl J Pharmacol* 2016; 11:741-9. (M23)

2. Gođevac D, Damjanović A, Stanojković TP, Anđelković B, Zdunić G. Identification of cytotoxic metabolites from *Mahonia aquifolium* using 1H NMR-based metabolomics approach. *J Pharmaceut Biomed* 2017; 150: 9-14. (M21)

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34):

1. Damjanović A, Kolundžija B, Matić IZ, Krivokuća A, Zdunić G, Janković R, Šavikin K, Stanojković T. *Mahonia aquifolium* extracts promote antimetastatic effects of doxorubicin. 2nd Special Conference EACR-AACR-SIC The Challenges of Optimising Immuno and Targeted Therapies From Cancer Biology to the Clinic. Proceeding book 2017; PP 212 (73). (M34)

2. Damjanović A, Antić Stanković J, Mijatović S, Zdunić G, Juranić Z. Investigation of antimicrobial effect of extracts *Mahonia aquifolium*. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS), 2017. (M34)

3. Damjanović Veličković A, Zdunić G, Šavikin K, Stanojković T. *In vitro* evaluation of the cytotoxic potential of *Mahonia aquifolium* extracts and their influence on sensitization of MDA-MB-231 breast cancer cells to doxorubicin. 2nd Congress of the Serbian Association for Cancer Research, Poster Sessions/ Proceedings book 2015; apstrakt PP20 (93).(M34)

5. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

U okviru doktorske disertacije dipl. farm. Ane Damjanović prvi put je ispitan antitumorski potencijal ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium*. Takođe, u okviru dela disertacije koji se bavio antimikrobnom aktivnošću ekstrakata, prvi put je ispitan uticaj ekstrakata na procese sinteze bitnih faktora virulencije mikroorganizama, kao i na zajednički uticaj ekstrakata ove biljne vrste sa antibioticima i antimikoticima koji su u širokoj upotrebi. Metode primenjene u hemijskoj analizi sastava ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium* detektovale su potencijalne agense odgovorne za biološke aktivnosti, a dale su i novi pristup u načinu identifikacije ciljnih agenasa nosilaca aktivnosti, bez njihove prethodne izolacije u čistom stanju iz biljnog izvora.

U ovoj doktorskoj disertaciji dokazan je antitumorski potencijal ekstrakata kore biljke *M. aquifolium*. U osnovi ovog efekta dokazano je da se nalazi aktivacija procesa apoptoze, čiji su mehanizmi takođe razjašnjeni. Osim uticaja na preživljavanje maligno

transformisanih ćelija pokazano je da ekstrakti poseduju i antimetastatski potencijal, koji se ogleda u inhibiciji migracije malignih ćelija i procesa angiogeneze, značajnih za rast i invazivnost tumora.

Potencijalni značaj koji bi ekstrakti ili njihovi aktivni principi mogli imati u terapiji onkolških bolesti potvrđen je rezultatima niza eksperimenata gde je detaljno ispitan uticaj ekstrakata u kombinaciji sa doksorubicinom, jednim od najčešće upotrebljivanih lekova u onkologiji danas. U okviru ovog dela disertacije svakako je najbitniji podatak da je zajednički efekat ekstrakata i doksorubicina sinergistički, što sugerise mogućnost da se primenom manjih doza leka zadrži njegova dobra aktivnost uz smanjenje učestalosti neželjenih efekata proisteklih iz toksičnosti leka.

Dobijeni rezultati o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium* u saglasnosti su sa do sada postojećim literaturnim podacima. Korak dalje u ispitivanju antimikrobnog potencijala napravljen je dokazivanjem da ekstrakti inhibiraju sintezu faktora virulencije odabranog bakterijskog soja. Ovde je posebno značajan podatak da oba ekstrakta inhibiraju sintezu biofilma, koji je odgovoran za izazivanje bolničkih infekcija, posebno u postoperativnim stanjima kod pacijenata izloženih medicinskim sredstvima kao što su implantati ili kateteri. Sinergistički efekat sa antibioticima/antimikoticima još jedan je bitan podatak, koji potvrđuje dobar antimikrobni potencijal ekstrakata.

Ispitivanjem bioloških aktivnosti ekstrakata kore biljne vrste *M. aquifolium* potvrđeni su literaturni podaci da su glavni nosioci aktivnosti predstanika roda *Mahonia* alkaloidi. Da bi se identifikovali prisutni alkaloidi u ovom biljnom izvoru korišćeni su ekstrakti bogati alkaloidima. Na ovaj način došlo se do preciznih podataka o glavnim nosiocima aktivnosti ove biljne vrste.

Dobijeni rezultati u okviru doktorske disertacije dipl. farm. Ane Damjanović pokazali su da biljka *M. aquifolium* svakako treba da bude predmet daljih naučnih istraživanja.

Predlog Komisije

Uvidom u doktorsku disertaciju dipl. farm. Ane Damjanović, Komisija zaključuje da je kandidatkinja uspešno realizovala unapred postavljene ciljeve istraživanja, da je doktorska disertacija dobro i jasno napisana, a da rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji imaju originalan i značajan naučni doprinos.

Rezultati doktorske disertacije do sada su publikovani u 2 rada, u časopisima od međunarodnog značaja (M21 i M23). Takođe, deo rezultata prikazan je na 3 međunarodna naučna skupa i u formi saopštenja štampan je u izvodu (M34).

Komisija pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju i smatra da sadrži sve relevantne elemente neophodne za ovakvu vrstu rada.

Komisija u navedenom sastavu predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji dipl. farm. Ane Damjanović i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„*In vitro* ispitivanje antitumorske i antimikrobne aktivnosti ekstrakata mahonije, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.“

Članovi Komisije:

1. _____
Dr sc. Jelena Antić Stanković, redovni profesor, mentor, predsednik komisije, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr sc. Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik, mentor
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

3. _____
Dr sc. Gordana Zdunić, viši naučni saradnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

U Beogradu, 26.01.2018.