

**MEDICINSKI FAKULTET  
UNIVERZITET U NIŠU  
NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**

**Odboru za poslediplomske studije**

**Predmet:** Izveštaj komisije za ocenu podobnosti kandidata i predložene teme za izradu doktorske disertacije

Nastavno-naučno veće Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu pokrenulo je postupak za izradu doktorske disertacije pod nazivom: „Uloga i značaj alfa-lipoiinske kiseline i nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze ćelija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija“, za sticanje naziva doktora medicinskih nauka – farmacija kandidata dipl.farm.Ivane Damnjanović i imenovalo komisiju za stručnu ocenu podobnosti kandidata i predložene teme za izradu doktorske disertacije u sastavu :

1. Prof. dr Stevo Najman, predsednik
2. Prof. dr Srđan Pešić, mentor i član
3. Prof. dr Gordana Kocić, član

Nakon uvida u priloženu dokumentaciju, navedena komisija podnosi sledeći

**IZVEŠTAJ KOMISIJE O PODOBNOSTI KANDIDATA I NAUČNOJ ZASNOVANOSTI TEME  
ZA IZRADU DOKTORSKE DISERTACIJE**

**1. Ocena podobnosti kandidata dipl.farm. Ivane Damnjanović**

**1.1. Biografija kandidata**

Ivana Damnjanović (rođ. Dedović) rođena je u Leskovcu 1983. godine gde je osnovnu i srednju medicinsku školu završila kao odličan đak.

Medicinski fakultet u Nišu, odsek farmacija, upisala je školske 2002/03. godine. Školovala se iz budžeta Republike Srbije. Diplomirala je u roku, jula 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,58 i odbranila diplomski rad iz predmeta Farmakokinetika sa ocenom 10. Državni ispit za diplomirane farmaceute je položila septembra 2008. godine. Akademske doktorske studije iz oblasti farmaceutskih nauka – Toksikologija upisala je, a februara 2009. godine.

Ivana Damnjanović je autor i koautor većeg broja naučnih radova publikovanih u domaćim i stranim časopisima. Aktivno se služi engleskim jezikom.

Zaposlena je kao saradnik u nastavi na predmetima Farmakokinetika, Klinička farmacija, Farmakoterapija i Farmakepidemiologija na Medicinskom fakultetu u Nišu od 1.10.2012. godine. U toku svog profesionalnog rada redovno se stručno usavršava i pohađa stručne edukacije iz oblasti farmacije i medicine.

## 2. Ocena podobnosti teme doktorske disertacije pod nazivom:

„Uloga i značaj alfa-lipoiinske kiseline i nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze ćelija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija“

### 2.1. Značaj i cilj istraživanja

Razvoj karcinoma je višestepeni proces u toku koga kumulativno dolazi do niza promena u ćelijskoj strukturi i funkciji. Iako su mnogi od procesa povezanih sa kancerogenezom pojedinačno intenzivno izučavani, molekularni mehanizmi koji ih povezuju i koji leže u osnovi kompleksne biologije humanih kancera još uvek su nedovoljno poznati. Nastanak karcinoma može se posmatrati kroz niz genetskih promena koji transformišu normalnu ćeliju u malignu dok je izbegavanje ćelijske smrti jedna od osnovnih promena koja vodi do maligne transformacije ćelije. Apoptoza je homeopatski proces koji omogućava da stare, mutirane ili oštećene ćelije umru. U ćelijama karcinoma taj mehanizam je često oštećen, maligne ćelije ne umiru, već nastavljaju proliferaciju. Proces kontrolisane ćelijske smrti predstavlja genetički regulisan proces jer je u kontroli ćelijske sudbine uključen veliki broj ćelijskih signala i ekspresija specifičnih gena.

Značaj ovog istraživanja ogleda u rasvetljavanju uloge hemopreventivnih agenasa u indukciji apoptoze u cilju povećanja efikasnosti standardnog citostatskog tretmana karcinoma kolona i cerviksa.

### 2.2. Naučna hipoteza

Terapija karcinoma se obično zasniva na delovanju jednog ili više citostatika, koji na različite načine zastavljaju ćelijski ciklus ispoljavajući visok stepen neželjenih efekata i razvoja rezistencije. Zato je pronalaženje novih ili unapređenje već postojećih agenasa, sa potencijalnim antitumorskim delovanjem, imperativ u savremenoj farmakoterapiji karcinoma. Povećanje efikasnosti citostatika može biti postignuto kombinovanom terapijom sa hemopreventivnim agensima čime se potencira efikasnost samog citostatika a smanjuju neželjeni efekti. Nakon analize rezultata prethodnih studija pretpostavljamo da:

1. postoji povezanost između kvantitativne ekspresije markera apoptoze, NF- $\kappa$ B, Bcl-2 i Bax i kontrole procesa ćelijske smrti,
2. postoji povezanost između hronične inflamacije i karcinogeneze,
3. postoji povezanost između pojačane ekspresije ciklooksigenaza i karcinogeneze kao i slabijeg odgovora na primenjeni citostatski tretman,
4. postoji povezanost između povećanje efikasnosti citostatika i kombinovane terapijom sa hemopreventivnim agensima.

### 2.3. Cilj rada

Polazeći od pretpostavke da postoji povezanost između kvantitativne ekspresije markera apozoze (NF- $\kappa$ B, Bcl-2 i Bax) i hronične inflamacije u kontroli procesa ćelijske smrti kao i odgovora na primenjeni citostatski tretman, cilj ovog istraživanja je:

1. Ispitivanje efekata alfa lipoiinske kiseline, ketoprofena, meloksikama i kombinacija ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa na proliferaciju ćelija, MTT testom u eseju ćelijske proliferacije,
2. Ispitivanje kvantitativne ekspresije NF- $\kappa$ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa i i primarne kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi,
3. Ispitivanje stepena apoptoze praćenjem kvantitativne ekspresije Bcl-2 i Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom,
4. Procenjivanje hemopreventivnog potencijala alfa lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama na osnovu kvantitativne ekspresije NF- $\kappa$ B, transkripcionog faktora uključenog u regulaciji gena koji utiču na nivo apoptoze, Bcl-2 i Bax u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi.

### 2.4. Metodologija rada

**Hemikalije.** U eksperimentu biće korišćene sledeće supstance: alfa lipoiinska kiselina (Berlition 300 ED, Berlin - Chemie, Nemačka 300mg/12ml), ketoprofen (Ketonol, Sandoz Pharmaceuticals, Switzerland 100 mg/ 2 ml), meloksikam (Movalis, Boehringer Ingelheim, 15mg/1.5ml), cisplatin (Cisplatin Ebewe, Ebewe Pharma Austrija, 10mg/20ml) i 5-fluorouracil (Fluorouracil Teva, Pharmachemie B.V. - Holandija, 50mg/ml). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal Bovine Serum), antibiotsko-antimikotični rastvor, L-Glutamine i Trypsin - EDTA rastvor su naručeni od PAA Laboratories, Austria, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) je naručen od Carl Roth, Germany dok je Trypan Blue Stain naručen od Invitrogen-a. Primarna i sekundarna anti-NF- $\kappa$ B, anti-Bcl-2 i anti-Bax antitelima su proizvođača Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Citostatici 5-fluorouracil i cisplatin se po protokolu koriste za lečenje karcinoma kolona i cerviksa (12).

**Koncentracije za in vitro istraživanje.** Alfa lipoiinska kiselina (ALA), ketoprofena (KT), meloksikama (MK), cisplatin (CP) i 5-fluorouracila (FU) će biti razblaživani u medijumu DMEM i ispitivaće se po tri koncentracije svake od navedenih supstanci (grupa 1 - najmanja koncentracija, grupa 2 - srednja koncentracija i grupa 3 - najveća koncentracija). Finalne koncentracije ispitivanih supstanci (izrazenih u  $\mu$ M) iznosiće: alfa-lipoiinska kiselina ALA<sub>1</sub>-10  $\mu$ M, ALA<sub>2</sub>-100  $\mu$ M i ALA<sub>3</sub>-1000  $\mu$ M); ketoprofen (KT<sub>1</sub>-2, KT<sub>2</sub>-20 i KT<sub>3</sub>-200  $\mu$ M), meloksikam

(MK<sub>1</sub>-10 μM, MK<sub>2</sub>-50 μM, MK<sub>3</sub>-500 μM), cisplatin (CP<sub>1</sub>-1.66 μM, CP<sub>2</sub>-3.32 μM i CP<sub>3</sub>-6.64 μM) i 5-fluorouracil (FU<sub>1</sub>-10 μM, FU<sub>2</sub>-100 μM i FU<sub>3</sub>-1000 μM). Ispitivane supstance (ALA, KT, MK) kombinovaće se sa 5-fluorouracilom i cisplatinom, retrospektivno. Kombinovanje ispitivanih supstanci sa standardnim citostaticima biće urađeno tako da su međusobno kombinovane najmanje koncentracija (ALA<sub>1</sub>-CP<sub>1</sub>, KT<sub>1</sub>-CP<sub>1</sub>, MK<sub>1</sub>-CP<sub>1</sub>, ALA<sub>1</sub>-FU<sub>1</sub>, KT<sub>1</sub>-FU<sub>1</sub>, MK<sub>1</sub>-FU<sub>1</sub>), zatim srednje (ALA<sub>2</sub>-CP<sub>2</sub>, KT<sub>2</sub>-CP<sub>2</sub>, MK<sub>2</sub>-CP<sub>2</sub>, ALA<sub>2</sub>-FU<sub>2</sub>, KT<sub>2</sub>-FU<sub>2</sub>, MK<sub>2</sub>-FU<sub>2</sub>) i na kraju najveće koncentracija (ALA<sub>3</sub>-CP<sub>3</sub>, KT<sub>3</sub>-CP<sub>3</sub>, MK<sub>3</sub>-CP<sub>3</sub>, ALA<sub>3</sub>-FU<sub>3</sub>, KT<sub>3</sub>-FU<sub>3</sub>, MK<sub>3</sub>-FU<sub>3</sub>). Pripremaće se kombinacije ispitivanih supstanci, alfa lipoinske kiseline, ketoprofena i meloksikama sa cisplatinom i 5-fluorouracilom, retrospektivno. Kombinacija ispitivanih supstanci u odnosu 1:1 će se vršiti tako da finalne koncentracije budu 2 puta manje od početnih.

**Ćelijske linije.** Ispitivanje će se vršiti na dve ćelijske linije, HeLa S3 (ćelije humanog karcinoma cerviksa) naručene od Leibniz Institute DSMZ i CaCo-2 (ćelije humanog kancera kolona) obtained from ATCC. Ćelije će biti kultivisane u medijumu DMEM sa dodatkom 10% FBS, antibiotik/antimikotik rastvora i 2 mM L-glutamina, na 37C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i zasićenoj vlažnošću. Zamena medijuma će biti rađena na svaka 2-3 dana.

**Primarna kultura.** Mononuklearne ćelije periferne krvi će biti izolovane u sterilnim uslovima, centrifugiranjem sa rastvorom Ficoll Histopaque® 1077 (Lymphoprep™, Nycomed Pharma, Zurich, Switzerland). Očekuje se da ćelijska vijabilnost bude 90% i ispitaće se pomoću rastvora Trypan blue. Nakon ispiranja u fiziološkom rastvoru, izolovane mononuklearne ćelije periferne krvi biće resuspendovane u DMEM-u sa dodatkom 10% FBS, L-glutamina i penicilin-streptomycin rastvora, nakon čega će mononuklearne ćelije periferne krvi biti zasađene u sterilne ploče sa 96 bunarčića, inkubirane 24h i tretirane ispitivanim supstancama (13).

**Esej proliferacije.** Kada ćelije obe ćelijske linije budu postigle 80% konfluentnosti biće odlepljene su rastvorom Trypsin/EDTA, isprane u rastvoru pufera i ukupan broj ćelija biće određen korišćenjem boje tripan plavo (Trypan blue dye exclusion test). Ćelije će biti posađene u sterilnim pločama sa 96 bunarčića u gustini  $2 \times 10^4$  ćelija po bunarčiću i kultivisane 24 h u standardnim uslovima. Nakon toga, ćelijama će se dodavati ispitivane supstance (alfa lipoinska kiselina, ketoprofen, meloksikam, cisplatin, 5-fluorouracil) kao i odgovarajuće kombinacije ovih supstanci u ispitivanim koncentracijama. Kontrolu će činiti ćelije inkubirane samo sa medijumom, bez dodavanja supstanci. Efekat ispitivanih supstanci na proliferaciju ćelija određivaće se nakon 48 h primenom MTT testa.

**MTT test.** MTT test se bazira na redukciji žute supstance MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) do ljubičastih kristala formazana koji su nerastvorni u vodi. Medijum u kome će se inkubirati ćelije, sa ili bez dodatih supstanci, biće izvučen po završetku inkubacije. Ćelje će biti isprane puferom i doda će se 20 μL of MTT rastvora koncentracije 1 mg/ml po bunarčiću. Nakon 3h inkubacije sa MTT-om na 37°C, nastali kristali formazana biće rastvoreni dodatkom 100 μl 2-propanola. Spektrofotometrijsko merenje redukcije MTT-a, odnosno intenziteta ljubičaste boje, vršiće se na talasnoj dužini od 540 nm na ELISA čitaču. Intenzitet ljubičaste boje je u direktnoj korelaciji sa brojem vijabilnih ćelija. Rezultati će biti prikazani kao stepen proliferacije ćelija (izražen u procentima) u odnosu na kontrolnu kulturu za koju je uzeta vrednost od 100%.

***Merenje nivoa transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B, Bcl-2 i Bax.*** Ćelije obe ćelijske linije, kao i primarna kultura mononuklearnih ćelija periferne krvi biće zasađene u sterilne ploče sa 96 bunarčića sa gustinom od  $3 \times 10^4$  ćelija po bunarčiću, retrospektivno i kultivisaće se pri standardnim uslovima ćelijske kulture 24 h. Nakon tog perioda dodavaće se supstance u ispitivanim koncentracijama i predviđenim kombinacijama, nakon čega će ćelije biti inkubirane 48h po protokolu istraživanja Kocić G. i sar. (14). Ćelije će se pažljivo isprati rastvorom fosfatnog pufera (PBS), fiksirati pomoću 70% metanola i permeabilizovati pomoću 0,1% Triton X-100 u PBS-u. Ćelije će biti inkubirane sa primarnim anti-NF- $\kappa$ B, anti-Bcl-2 i anti-Bax antitelima, isprane 3 puta, a zatim inkubirane sa FITC sekundarnim antitelima. Srednji intenzitet fluorescence određivaće se i analizirati na Victor™ multiplate reader (Perkin Elmer-Wallace, Wellesley, MA). Rezultati će biti prikazani kao procentualna promena u odnosu na kontrolu.

### **Mesto i institucija obavljanja istraživanja**

Istraživanje će biti sprovedeno u laboratoriji za ćelijsku kulturu, odeljenja za ćelijski i tkivni inženjering i laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku Centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

## **Zaključak**

Na osnovu napred iznetih podataka, Komisija daje pozitivno mišljenje o kandidatu i predloženoj temi, te predlaže odboru za poslediplomske studije i Nastavno-naučnom veću Medicinskog fakulteta u Nišu da kandidatu dipl.farm. Ivani Damnjanović odobri izradu doktorske disertacije pod nazivom :

„Uloga i značaj alfa-lipoiniske kiseline i nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze ćelija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija“

## **KOMISIJA**

1. Prof. dr Stevo Najman, predsednik

-----

2. Prof. dr Srđan Pešić, mentor i član

-----

3. Prof. dr Gordana Kocić, član

-----

## **NAZIV DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Naziv doktorske disertacije na srpskom jeziku:**

Uloga i značaj alfa-lipoiinske kiseline i nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze ćelija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija

### **Naziv doktorske disertacije na engleskom jeziku :**

The role and significance of alpha-lipoic acid and non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention and induction of apoptosis in colon and cervix cancer cell lines - *in vitro* study

## Spisak naučnih radova mentora Prof. dr Srđana Pešića

1. **Pesic S**, Grbovic L, Stoiljkovic M, Nikolic V, Djokic J. Functional characterization of the muscarinic receptors involved in endothelium-dependent relaxation in isolated canine uterine artery. *J Vet Pharmacol Ther* 2009; 32(2):109-115. IF: 1.408
  2. Nikolic VN, Jankovic SM, Velickovic-Radovanović R, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, **Pesic S**, Jevtovic-Stoimenov T, Djuric J, Markovic V, Milovanovic JR. Population pharmacokinetics of carvedilol in patients with congestive heart failure. *J Pharm Sci* 2013;102(8): 2851-2858. IF: 3.130
  3. Nikolic VN, Jevtovic-Stoimenov T, Stokanovic D, Milovanovic M, Velickovic-Radovanović R, **Pesic S**, Stoiljkovic M, Pesic G, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Stefanovic N, Jankovic SM. An inverse correlation between TNF alpha serum levels and heart rate variability in patients with heart failure. *J Cardiology* 2013; 62(1):37-43. IF: 2.298
  4. Milovanovic M, Pesic G, Nikolic V, Jevtovic-Stoimenov T, Vasic K, Jovic Z, Deljanin-Ilic M, **Pesic S**. Vitamin D deficiency is associated with increased il-17 and tnf  $\alpha$  levels in patients with chronic heart failure. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2012; 98(3):259-265. IF: 1.130
- Tasic S, Miladinovic-Tasic N, Djordjevic J, **Pesic S**, Avramovic M. Ten-year prevalence of fungal peritonitis in the city of Nis, South Serbia. *Central European Journal of Medicine* 2010; 5(1):49-52. IF: 0.244



## **Obrazloženje teme**

Terapija karcinoma se obično zasniva na delovanju jednog ili više citostatika, koji na različite načine zastavljaju ćelijski ciklus ispoljavajući visok stepen neželjenih efekata i razvoja rezistencije. Zato je pronalaženje novih ili unapređenje već postojećih agenasa, sa potencijalnim antitumorskim delovanjem, imperativ u savremenoj farmakoterapiji karcinoma. Povećanje efikasnosti citostatika može biti postignuto kombinovanom terapijom sa hemopreventivnim agenasima čime se potencira efikasnost samog citostatika a smanjuju neželjeni efekti.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje povezanosti između kvantitativne ekspresije markera apopoze (NF- $\kappa$ B, Bcl-2 i Bax) i hronične inflamacije u kontroli procesa ćelijske smrti i procenjivanje hemopreventivnog potencijala alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama u tretmanu ćelijskih linija karcinoma kolona i cerviksa.

Očekuje se da ova studija dodatno pojasni značaj indukcije apoptoze pomoću hemopreventivnih agenasa u cilju povećanja efikasnosti standardnog citostatskog tretmana karcinoma kolona i cerviksa.

## **Subject discussion**

The treatment of cancer is usually based on the activity of one or more chemotherapeutic agents, which stop the cell cycle in a variety of ways, by showing a high level of adverse effects and development of resistance. Therefore, the finding of new or improvement of existing agents with potential antitumor activity is imperative in contemporary pharmacotherapy of cancer. Increasing the efficiency of chemotherapeutic agents can be achieved by combining the treatment with chemopreventive agents, which would enhance the the effectiveness of cytostatics and reduce the side effects.

The aim of this study was to investigate the connection between the quantitative expression of the apoptosis marker (NF -  $\kappa$ B , Bcl -2 and Bax ) and the chronic inflammation in control of the cell death process and the evaluation of the chemopreventive potential of the alpha-lipoic acid, ketoprofen and meloxicam for the treatment of colon and cervix cancer cell lines.

It is expected that this study will further elaborate the significance of the induction of apoptosis via chemopreventive agents in order to enhance the efficiency of the standard citostatic treatment of colon and cervix cancer.

## Spisak naučnih radova kandidata dipl.farm. Ivane Damjanović

1. G. Kocic, V. Pavlovic, L.J. Saranac, R. Kocic, S. Zivic, D. Sokolovic, T. Jevtovic, G. Nikolic, S. Stojanovic, **I. Damjanovic**. Circulating nucleic acids in type 1 diabetes may modulate the thymocyte turnover rate. *Cell immunol* 2010; 266(1): 76-82. IF: 2,575 (M23)
2. Conic I, Miljkovic S, Tošic-Golubovic S, Stanojevic Z, Milenkovic D, Djordevic B, **Damjanovic I**, Visnjic M, Antic S, Stefanovic V. Anxiety levels related to type of therapy for cervical cancer. *Central European Journal of Medicine* 2012; 7(4): 490-496. IF: 0.262. (M23)
3. **Damjanović I**, Velickovic-Radovanovic R, Kocic R, Zlatkovic-Guberinic, Sokolovic D, Djindjic, N, Conic I. Uticaj beta blokatora na insulinsku rezistenciju kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2. *Acta Medica Medianae* 2011; 50(4): 23-28. (M52)