

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 05. септембра 2016. године, прихваћено је обавештење ментора др Биљане Божић да је Невена Тишма, запослена у Институту за онкологију и радиологију Србије, завршила израду докторске дисертације под насловом „Испитивање имуномодулаторног и цитотоксичног ефекта воденог екстракта беле имеле (*Viscum album* L.) *in vitro* и у пацијенткиња на терапији антрациклинским хемиотерапеутицима“. На истој седници је одређена Комисија за преглед и оцену готове докторске дисертације у саставу: др Биљана Божић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Татјана Срдић-Рајић, виши научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије, др Биљана Драшковић Павловић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

Комисија је детаљно проучила приложену докторску дисертацију кандидаткње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Невене Тишме под насловом „Испитивање имуномодулаторног и цитотоксичног ефекта воденог екстракта беле имеле (*Viscum album* L.) *in vitro* и у пацијенткиња на терапији антрациклинским хемиотерапеутицима“ обухвата 153 стране текста без прилога, 38 графика, 5 слика и 5 табела. Текст је подељен на осам поглавља: Увод (20 страна), Циљ истраживања (2 стране), Материјал и методе (25 страна), Резултати (62 стране), Дискусија (22 стране), Закључак (2 стране), Литература (19 страна) и Прилози.

Предмет докторске дисертације је испитивање молекуларних механизма који леже у основи имуномодулаторног дејства екстракта беле имеле (лат. *Viscum album*) на ћелије имунског система здравих добровољаца, као и испитивање цитотоксичног ефекта екстракта беле имеле на туморске ћелије у култури у присуству или одсуству доксорубицина. Такође, део ове докторске дисертације је посвећен испитивању ефекта екстракта беле имеле на број леукоцита и квалитет живота пацијенткиња оболелих од

карцинома дојке. Резултати које је кандидаткиња приказала у свом раду представљају значајан допринос испитивању туморске резистенције на хемиотерапеутике, могућностима за смањење њихове токсичности и доприносе бољем разумевању механизма интеракције биоактивних састојака екстракта беле имеле и антитуморских цитотоксичних лекова. Посебно су значајни резултати који се односе на ефекат и механизме деловања екстракта беле имеле на функције тромбоцита о чему у литератури нема доступних података.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У уводном делу тезе обрађена су општа и савремена сазнања везана за ужу научну област која је била предмет истраживања. Први део овог поглавља посвећен је најзначајнијим проблемима у терапији оболелих од тумора: појави резистенције на хемиотерапеутика и њиховој токсичности. Детаљно су описане карактеристике цитотоксичних лекова из групе антрациклина, пре свега доксорубицина, са акцентом на механизам дејства и његову токсичност. Обзиром да је један од најзначајнијих механизма деловања хемиотерапеутика индукција апоптозе туморских ћелија, значајан део увода је посвећен механизмима апоптотске смрти ћелије и значају поремећаја процеса апоптозе туморских ћелија у појави резистенције на примењене лекове.

Велики број епидемиолошких студија, као и резултати експерименталних истраживања указују на значајну улогу тромбоцита у патогенези и прогресији тумора. Повећана активација тромбоцита, хиперкоагулабилност и тромбоцитопенија су чести пратећи знаци малигних болести. Секвестрација тромбоцита омогућава малигним ћелијама да избегну имунске механизме контроле развоја тумора и стога доприноси њиховом метастаском потенцијалу. С друге стране, макрофаге представљају доминантну популацију туморског микроокружења. Оне учествују у обнови нормалне функције оштећеног ткива, али током интеракције са туморским ћелијама долази до промена у њиховим својствима што има за последицу имunosупресију и промоцију раста тумора. Наиме, различити типови тумора продукују спектар цитокина и хемокина који могу индуковати фенотипску и функционалну поларизацију макрофага.

Због тога и тромбоцити и макрофаги представљају потенцијалне циљне ћелије за испитивање нових фармаколошких средстава са циљем побољшања одговора на конвенционалне хемиотерапеутике.

Бела имела се традиционално користи као комплементарна терапија уз стандардну хемиотерапију или радиотерапију код различитих врста тумора и показује позитивне ефекте на квалитет живота пацијената. Истраживања *in vitro* и на животињским моделима указују на потенцијално антитуморско, антиинфламаторно и имуномодулаторно дејство екстракта беле имеле. Међутим, још увек су недовољно изучени механизми који се налазе у основи уочених ефеката, а посебно механизми интеракције биоактивних компоненти беле имеле и различитих хемиотерапеутика.

У поглављу *Циљеви истраживања* кандидаткиња је поставила две радне хипотезе које проистичу из података наведених у уводном делу:

1. Екстракт беле имеле сензибилше туморске ћелијске линије у култури при субтерапеутским концентрацијама доксорубицина.
2. Примена комплементарне терапије екстрактом беле имеле доводи до побољшања квалитета живота и смањује инциденцу неутропеније код пацијенткиња оболелих од карцинома дојке лечених стандардним хемиотерапијским протоколом.

На основу постављених хипотеза дефинисани су следећи циљеви истраживања:

1. Испитати цитотоксични ефекат екстракта беле имеле и молекуларне механизме интеракције биоактивних компоненти екстракта са доксорубицином у култури ћелијских линија карцинома дојке (MDA-MB-231 и MCF7), карцинома дебелог црева (T84), хроничне мијелоидне леукемије (K562) и акутне Т ћелијске леукемије (Jurkat) ;
2. Испитати имуномодулаторно дејство екстракта беле имеле (лат. *Viscum album*) на ћелије имунског система *in vitro* и *in vivo* код пацијенткиња оболелих од карцинома дојке на терапији циклофосамидом, адријамицином, и 5-флуоро-урацилом (ЦАФ), у трајању од шест циклуса.

У складу са постављеним циљевима дефинисани су следећи истраживачки задаци:

1. Испитати цитотоксично/антипролиферативно дејства екстракта беле имеле на туморске ћелијске линије у присуству/одсуству доксорубицина *in vitro*.
2. Испитати проапоптотско дејство екстракта беле имеле на туморске ћелијске линије у присуству/одсуству доксорубицина *in vitro*.
3. Испитати утицај екстракта беле имеле на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса у присуству/одсуству доксорубицина *in vitro*.
4. Испитати сигналне путеве којима екстракт беле имеле испољава цитотоксични/антипролиферативни ефекат на туморске ћелијске линије у

присуству/одсуству доксорубицина *in vitro*.

5. Испитати дејство екстракта беле имеле на активациони статус тромбоцита здравих особа *in vitro*.

6. Испитати дејство екстракта беле имеле на активацију ћелијске линије моноцита, ТНР-1, самих и у присуству тромбоцита *in vitro*.

7. Испитати дејство екстракта беле имеле на број и дистрибуцију субпопулација леукоцита периферне крви пацијенткиња оболелих од карцинома дојке на терапији циклофосфамидом, адријамицином и 5-флуоро-урацилом.

У поглављу *Материјал и методе* кандидаткиња детаљно наводи све технике које су коришћене при изради тезе. На основу података изнетих у овом поглављу дисертације може се закључити да је кандидаткиња сачинила оптималан избор савремених техника које у потпуности одговарају проблематици истраживања. Описан је метод добијања екстракта беле имеле, као и методе за одређивање концентрације укупних протеина Bradford тестом и укупних фенола, а све у циљу карактеризације самог екстракта.

In vitro тестови рађени су на туморским ћелијским линијама добијеним од American Type Culture Collection (Rockville, MD). За испитивање цитотоксичног и антипролиферативног ефеката испитиваног екстракта и доксорубицина коришћен је МТТ тест. Антипролиферативни ефекат је даље испитиван одређивањем заступљености ћелија по фазама ћелијског циклуса коришћењем методе проточне цитометрије бојењем пропидијум јодидом, као и тестом формирања колонија. Ниво циклина је одређиван интраћелијским бојењем специфичним антителима применом проточне цитометрије. Двоколорним бојењем ћелија са Annexin V-FITC/пропидијум јодидом коришћењем проточног цитометра одређивана је проапоптотска способност испитиваног екстракта, као и доксорубицина. Сигнални путеви укључени у апоптотску ћелијску смрт туморских ћелија индуковану од стране испитиваног екстракта и доксорубицина су испитивани проточном цитометријском анализом мерењем митохондријског мембранског потенцијала једноколорним бојењем родамином 123 и мерењем нивоа експресије протеина повезаних са апоптозом. Такође је мерен и генски ниво експресије истих протеина Real-time PCR методом. Методом проточне цитометрије одређена је количина доксорубицина која улази, односно излази из третираних ћелија. Бојењем β -галактозидазом је одређивано присуство сенесцентних ћелија након третмана туморских ћелија.

Параметри активације тромбоцита и њихове агрегације са леукоцитима одређивани су

проточном цитометријом.

Активација моноцита у култури и кокултури са тромбоцитима је одређивана мерењем продукције TNF- α ELISA тестом, као и мерењем нивоа слободних кисеоничних радикала једноколорним бојењем DCFH-DA бојом и мерењем експресије CD11b проточном цитометријом.

Описан је детаљан протокол клиничке студије. Анализа ћелија периферне крви рађена је методом проточне цитометрије.

У поглављу *Резултати*, кандидат је дао преглед добијених резултата спроведеног истраживања. У складу са наведеним циљевима рад је подељен у две целине. Прва се односи на испитивање молекуларних механизма који леже у основи цитотоксичног и имуномодулатрног дејства екстракта беле имеле, као и интеракције биоактивних компоненти беле имеле са цитотоксичним агенсом из групе антрацилина на моделу туморских ћелија у култури. Други део се односи на испитивање дејства екстракта беле имеле на леукоците пацијенткиња оболелих од карцинома дојке.

У првом делу поглавља *Резултати* показано је да испитивани екстракт има цитотоксичну, односно антипролиферативну активност на готово свим тестираним малигним ћелијама (изузев Т84 ћелијске линије) у фармаколошки оправданом распону концентрација, као и да је та цитотоксичност селективна према туморским ћелијама у поређењу са контролним моноклеарним ћелијама периферне крви. Такође је показано да испитивани екстракт сам и у комбинацији са доксорубицином доводи до промена у заступљености ћелија по фазама ћелијског циклуса, као и да има способност да изазове апоптотску смрт туморских ћелија и то превасходно преко унутрашњег митохондријског пута. Показан је повишен ниво каспазе 3 и Вах протеина након третмана туморских ћелија испитиваним екстрактом, као и његовом комбинацијом са доксорубицином. Такође је показана промена и у нивоу протеинске експресије циклина Б1 и Д1, након третмана туморских ћелија екстрактом беле имеле у комбинацији са доксорубицином у поређењу са нивоом ових протеина у ћелијама третираним само доксорубицином. Показано је да екстракт беле имеле може да преведе туморске ћелије из сенесцентног стања индукованог субапоптотском концентрацијом доксорубицина у стање апоптозе. Резултати добијени мерењем уласка, односно изласка доксорубицина из третираних ћелија су показали да знатно већа количина доксорубицина у комбинацији са екстрактом уђе у туморске ћелије, него у лимфоците, као и да је количина доксорубицина која уђе третирањем ћелија

комбинацијом супстанци мања него количина доксорубицина при монотретману. Показано је да екстракт беле имеле у концентрацији знатно нижој од токсичне испољава цитопротективни ефекат на лимфоците периферне крви. Истовремена примена екстракта и доксорубицина не утиче значајно на излазак доксорубицина из ћелија. Такође је показана способност испитиваног екстракта да модулише активацију и хетеротипску интеракцију активираних тромбоцита са моноцитима у *ex vivo* условима. Екстракт беле имеле доводи до смањења експресије П-селектина, што је показано смањењем процента П-селектин позитивних тромбоцита у укупној популацији активираних тромбоцита изложених испитиваном екстракту, као и смањењем индекса активације тромбоцита у односу на експресију П-селектина. Упоредо са утицајем на експресију П-селектина екстракт беле имеле доводи и до смањења хетеротипске агрегације тромбоцита посредоване П-селектином, што је показано смањењем процента агрегата тромбоцита и моноцита у укупној популацији моноцита изложених испитиваном екстракту, као и смањењем индекса агрегације тромбоцита са моноцитима. Показано је да екстракт беле имеле стимулише ослобађање TNF- α у хранљиви медијум из проинфламаторних M1 макрофага, као и да је активација моноцита/макрофага под дејством екстракта селективна и ограничена искључиво на стимулацију ослобађања TNF- α . Све ово указује да екстракт беле имеле има TNF- α посредовано антитуморско дејство без пратећих компликација у смислу неспецифичне активације моноцита.

У делу поглавља који се односи на резултате клиничке студије показано је да препарат беле имеле не пружа ефикасну заштиту популацији лимфоцита од деловања цитотоксичних агенаса, што указује да статус појединих популација ћелија имунског система у периферној крви не рефлектује стање у самом тумору и да је деловање на популације ћелија које инфилтрирају сам тумор и последични ефекти недостајућа карика. Такође је показано да биоактивне компоненте беле имеле као комплементарна терапија побољшавају квалитет живота пацијенткиња оболелих од карцинома дојке.

У поглављу *Дискусија*, кандидаткиња успешно повезује у целину добијене резултате и проналази њихов значај у оквиру испитиване проблематике. Потврђени су подаци познати из литературе да механизми антитуморског деловања екстракта беле имеле у *in vitro* условима укључују цитотоксично деловање индукујући апоптозу. По први пут је показано да екстракт беле имеле може да преведе туморске ћелије из сенесцентног стања индукованог субапоптотском концентрацијом доксорубицина у стање апоптозе. То

значи да уколико се екстракт беле имеле користи као комплементарна терапија, могуће је при знатно нижим, мање токсичним концентрацијама хемиотерапеутика постићи жељени ефекат на туморске ћелије.

Такође, показана је способност испитиваног екстракта да модулише хетеротипску интеракцију активираних тромбоцита и моноцита у *ex vivo* условима као кључног догађаја у патогенези атеросклерозе и кардиоваскуларних компликација, као пратећих симптома малигнух болести. Показана способност екстракта да модулише агрегацију тромбоцита и моноцита указује да може постојати утицај и на интеракцију активираних тромбоцита и туморских ћелија, као и потенцијални утицај на њихову секвестрацију, интеракцију са ендотелним ћелијама и утицај на екстравазацију секвестрираних туморских ћелија, као и дејство активираних тромбоцита на ослобађање фактора раста значајних за процес ангиогенезе. Узимајући у обзир стимулаторно дејство екстракта беле имеле на моноците и макрофаге, чиме се потенцира њихов антиканцерогени потенцијал, као и смањење агрегације моноцита са тромбоцитима, деловањем директно на тромбоците, представља регулаторни протективни механизам у склопу плејотропног антиканцерског потенцијала испитиване биљке. Све ово чини дати екстракт интересантним за даља научна и клиничка испитивања.

Такође, потврђени су резултати бројних клиничких студија да биоактивне компоненте беле имеле имају потенцијал да побољшају квалитет живота пацијената оболелих од карцинома. Значајн део дискусије посвећен је и разматрању питања које се намеће, имајући на уму резултате *in vitro* и *in vivo* експеримената и многобројних клиничких студија, зашто не постоје јасни докази о ефекту екстракта беле имеле на имунски статус пацијената оболелих од карцинома. Ова студија указује да би било потребно изменити дизајн студија које се баве испитивањем ефеката екстракта беле имеле и то пре свега у погледу начина третирања пацијената.

Кроз поглавље *Закључак* кандидаткиња наводи најзначајније закључке произашле из резултата истраживања.

Увид у цитирану *Литературу* показује да је кандидаткиња студиозно приступила истраживању и избором релевантне литературе успешно испунила задате циљеве.

На самом крају, кандидаткиња кроз *Прилог* даје увид у коначан исход свог истраживања и потврђује његову релевантност приказивањем штампане верзије објављених радова који садрже резултате презентоване у оквиру докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21**
Tröger W, Zdrale Z, Tišma N, Matijašević M. Additional Therapy with a Mistletoe Product during Adjuvant Chemotherapy of Breast Cancer Patients Improves Quality of Life: An Open Randomized Clinical Pilot Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:430518.
2. **M23**
Srdic-Rajic T, Tisma-Miletic N, Cavic M, Kanjer K, Savikin K, Galun D, Konic-Ristic A, Zoranovic T. Sensitization of K562 Leukemia Cells to Doxorubicin by the *Viscum album* Extract. *Phytother Res.* 2016 Mar;30(3):485-95. doi:10.1002/ptr.5554. Epub 2015 Dec 21.

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M51**
Tatjana, Srđić-Rajić; Aleksandra, Konić-Ristić; Nevena, Tišma-Miletić; Nevena, Kardum; Danijel, Galun; Sikimić, Jelena; Glibetić, Marija; Miroslav, Milićević. Efekti ekstrakta bele imele na markere aktivacije i agregacije trombocita. April 2015. *Acta Chirurgica Iugoslavica*;2015, Vol. 62 Issue 2, p5

Međunarodni časopis, nema M kategoriju

Tröger W, Jezdić S, Zdrale Z, Tišma N, Hamre HJ, Matijašević M. Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone. *Breast Cancer (Auckl)*. 2009 Jul 6;3:35-45.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Анализа готове докторске дисертације Невене Тишме указује да су сви постављени циљеве истраживања успешно испуњени. Кандидаткиња је показала широко познавање научне области које задата тема обухвата, самосталност у планирању и извођењу експеримената, критичко разматрање резултата у светлу познатих литературних података, као и способност доношења адекватних закључака. Докторска дисертација Невене Тишме представља оригиналан научни рад у области истраживања о молекуларним механизмима који леже у основи имуномодулаторне и цитотоксичне активности екстракта беле имеле. На основу свега наведеног, предлажемо Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану докторске дисертације Невене Тишме под насловом: „Испитивање имуномодулаторног и цитотоксичног ефекта воденог екстракта беле имеле (*Viscum album L.*) *in vitro* и у пацијенткиња на терапији антрациклинским хемиотерапеутицима“.

У Београду, 07.09.2016. године.

КОМИСИЈА:

др Биљана Божић, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Татјана Срдић-Рајић, виши научни сарадник
Института за онкологију и радиологију Србије

др Биљана Драшковић Павловић, доцент
Медицинског факултета Војномедицинске академије
Универзитета одбране у Београду