

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИЈАВА	04.06.19	
Основа		ЈЕДИНОСТ
05	7134/2-2	

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-385/28, од 14.05.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Јована Луковића** под називом:

„ Испитивање *in vitro* антитуморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла “

На основу одлуке Већа за медицинске науке формирана је комисија у саставу:

1. **Доц. др Марија Анђелковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, председник;
2. **Проф. др Зоран Ратковић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Органска хемија*, члан;
3. **Доц. др Јелена Башић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Биохемија*, члан;
4. **Доц. др Милан Зарић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, члан;
5. **Доц. др Петар Чановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат Јован Луковић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат Јован Луковић рођен је 13.05.1986. године у Крагујевцу. Основну школу и гимназију завршио је у Крагујевцу, Интегрисане академске студије хемије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу завршио је у децембру 2013. године са просечном оценом 8.59. Школске 2014/2015. године уписао је Академске докторске студије смер Клиничка и експериментална биохемија, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит положио је септембра 2017. године са оценом 10.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Испитивање *in vitro* антитуморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла“

Предмет: Хемијска структура халкона, коју карактеришу два арил прстена повезана α , β -незасићеним кетоном, омогућава широк спектар биолошких активности од којих су најзначајнија антиканцерогена, антиинфламаторна и антиоксидативна дејства. Променама у хемијској структури халкона добијени су многи деривати и аналози халкона који се могу користити за развој нових антиканцерогених терапеутика. У нашој студији биће испитиван антитуморски ефекат, до сада неиспитаних аналога халкона на различитим туморским ћелијама хуманог порекла. Предност ових аналога халкона у односу на остале халконе је у томе што представљају мање молекуле са једноставнијом хемијском структуром при чему

брже улазе у ћелију, а такође имају већи степен селективности према туморским ћелијама и бољу инхибицију прогресије раста тумора у односу на цисплатину као референтну супстанцу.

Хипотезе:

- Аналоги халкона испољавају цитотоксични ефекат на хумане туморске ћелије, при чему не делују цитотоксично на здраве ћелије хуманих фибробласта.
- Халкони индукују апоптозу хуманих туморских ћелија активирањем митохондријалног апоптотског пута, уз могуће учешће аутофагије која доприноси процесу апоптозе.
- Аналоги халкона повећавају експресију активног Вах-а и смањују експресију Bcl-2 протеина у хуманим туморским ћелијама што доводи до транслокације цитохрома ц из интрамембранског простора у цитосол ћелије и последичне активације каспазе 3.

Хипотезе ће бити тестиране кроз серију *in vitro* експеримената.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат Јован Луковић је објавио рад у целини у часопису категорије М51 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Lukovic J, Mitrovic M, Zelen I, Canovic P, Zaric M, Nikolic I. Antitumor Effect of the Chalcone Analogue, (E) -1- (4-Ethoxy-3-Methoxyphenyl) -5- Methylhex-1-en-3-One on HeLa Cell Line. Ser J Exp Clin Res. 2018;doi:10.2478/sjecr-2018-0048. M51

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Упркос великом напретку у дијагностици и терапији малигних болести протеклих година, карциноми представљају главни узрок смрти у популацији широм света. Резистенција ћелија тумора према антиканцерогеним лековима као и неселективност терапеутика према

здравим ћелијама представљају најчешћа нежељена дејства антитуморске терапије. Услед тога неопходно је синтетисати нове, ефикасније супстанце које ће редуковати или у потпуности отклонити нежељена дејства. Халкони су ароматични кетони који представљају прекурсоре за биосинтезу флавоноида, изофлавоноида и других биолошки активних хетероцикличних једињења. На основу својих хемијских особина халкони испољавају различите фармаколошке ефекте, од којих су најзначајнији антитуморски, антиинфламаторни и антиоксидативни ефекат. Халкони у својој структури садрже два ароматична прстена (А и Б) који су повезани угљеничним α , β – незасићеним карбонилним системом са три угљеникова атома. Деривати и аналози халкона испољавају ефикаснији антитуморски ефекат на различите врсте ћелија тумора у односу на природне халконе, при чему индукују апоптозу у туморским ћелијама активирањем унутрашњег и/или спољашњег апоптозог пута што је често праћено активирањем аутофагије која доприноси процесу апоптозе. Пошто аналози халкона испољавају антитуморски ефекат индуковањем апоптозе која је праћена активирањем аутофагије, комбиновани третман са инхибиторима аутофагије може бити добра стратегија за побољшање ефикасности хемотерапије.

2.5. Значај и циљ истраживања

Циљ овог истраживања представља испитивање антитуморског ефекта седам аналога халкона: (Е)-1-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН1), (Е)-1-(3,4-диметоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН2), (Е)-1-(4-етокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН3), (Е)-1-(4-изопропокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН4), (Е)-1-(3-метокси-4-пропоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН5), (Е)-1-(4-бутокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН6), (Е)-1-(4-(бензилокси)-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (СН7) на три различите врсте туморских ћелија хуманог порекла (HeLa – хумани карцином цервикса, НСТ-116 – хумани карцином колона и MDA-MB-231 – хумани

аденокарцином дојке), као и на здраве фибробласте плућа као контролне ћелије (MRC-5). Као контролне супстанце користићемо цисплатину (cisPt) и дехидрозингерон (DHZ).

1. Утврдити потенцијални цитотоксични ефекат аналога халкона на поменуте туморске ћелије.
2. Испитати који од синтетисаних аналога халкона не испољава статистички значајан цитотоксични ефекат према здравим ћелијама и упоредити њихов цитотоксични ефекат са ефектом референтних супстанци.
3. Детектовати и упоредити морфолошке промене третираних ћелија у односу на морфологију контролних ћелија помоћу фазног микроскопа.
4. Утврдити који тип ћелијске смрти је доминантан (апоптоза или некроза) и утврдити да ли и у коликој мери процес аутофагије утиче на цитотоксичност испитиваних супстанци према туморским ћелијама.
5. Утврдити дејство испитиваних супстанци на експресију, локализацију и активацију про-апоптотичног Вах протеина, анти-апоптотичног Bcl-2 протеина и активне каспазе-3 након третмана испитиваним супстанцама на хумане туморске ћелије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Истраживања су показала да природни халкон Флавокаваин С (изоливан из корена биљке Каве) испољава ефикаснији цитотоксични ефекат на HCT-116 – ћелије хуманог карцинома колона у односу на MCF-7, A549, HT-29 – ћелије хуманог аденокарцинома колона и CaSki – ћелије хуманог карцинома цервикса. Флавокаваин С испољава јачи цитотоксични ефекат у поређењу са цисплатином, док је цитотоксични ефекат на здраве ћелије (CCD-18Co) значајно смањен. Природни халкон, Millerachine (из *Millettia pachycarpa*) испољава значајну антитуморску активност на ћелије хуманог карцинома јајника (SK-OV-3 и A2780S) која је

посредована инхибицијом топоизомеразе II чиме се индукује оштећење DNK молекула туморских ћелија.

Различити синтетисани аналози халкона испољавају значајно већи цитотоксични ефекат на HeLa, A549 и LS174 у односу на ефекат на здраве ћелије хуманих фибробласта. Такође, аналози халкона испољавају значајан цитотоксични и апоптотични ефекат на ћелије акутне T лимфоцитне леукемије (Jurkat) и HeLa ћелије у односу на здраве HUVEC ћелије и инхибирају раст тумора у Jurkat ћелијама заустављањем ћелијског циклуса у G2/M фази.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална *in vitro* студија на материјалу хуманог порекла.

2.7.2. Популација која се истражује

За потребе истраживања користе се туморске ћелијске линије различитог порекла и инвазивности: HeLa – хумани карцином цервикса, HCT-116 – хумани карцином колона и MDA-MB-231 – хумани аденокарцином дојке. Као здрава контрола користе се ћелијска линија фибробласте плућа (MRC-5).

2.7.3. Варијабле које се мере у студији

За све узорке који буду укључени у студији биће одређивана вијабилност ћелија на 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама аналога халкона коришћењем МТТ теста. Тип ћелијске смрти (апоптоза и/или некроза и/или аутофагија) биће утврђен употребом проточне цитометрије (*Flow*) коришћењем Annexin V-FITC/7-аминоактиномицином D бојења. Такође, проточна цитометрија биће коришћена као метода за утврђивање доприноса аутофагије на апоптозу индуковану аналозима халкона употребом акридин-оранж бојења. За одређивање експресије и локализације регулаторних протеина апоптозе: активног Вах-а, Bcl-2

протеина и каспазе-3 биће коришћена метода проточне цитометрије, где ће бојењем специфичним антителима бити одређен проценат ћелија код којих је дошло до транслокације цитохрома *c*, активације Вах-а и каспазе-3 у групи третираних у односу на нетретиране ћелије. Такође, за потврду експресије, локализације и активације регулаторних протеина апоптозе биће коришћена метода флуоресцентне микроскопије где ће ћелије бити инкубиране примарним и секундарним антителима.

Независне варијабле: представљаће цитотоксични и апоптотични ефекат испитиваних аналога халкона.

Зависне варијабле: представљаће измерене вредности параметара цитотоксичног и апоптотичног ефекта испитиваних аналога халкона.

2.7.4. **Снага студије и величина узорка**

Величина група је одређена на основу почетних параметара : снага студије од 95%, вероватноће грешке првог типа (α) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе. Укупна величина узорка (total sample size = 54) је израчуната помоћу програма *G power* и коришћењем теста корелације. Вредност коефицијента детерминације (r^2) је 0.2.

2.7.5. **Статистичка анализа**

Целокупна статистичка анализа биће вршена помоћу софтвера SPSS верзије 20. Подаци ће бити израчунати као проценат добијен од триплицатног експеримента и изражен као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистичке разлике између средњих вредности биће анализирани помоћу Студентовог t-testa или ANOVA теста за узорке који прате нормалну расподелу, односно помоћу Kruskal-Wallis-овог или Friedman-овог теста за узорке који не прате нормалну расподелу. Након одабира теста и обраде података биће добијена вредност *p*.

Статистички значајним резултатима сматраће се они резултати чија је вредност p након обраде података мања од 0.05.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Предложена студија би требало да нам да одговор на то:

1. Да ли сви аналози халкона испољавају ефикаснији цитотоксични и апоптотични ефекат на хумане туморске ћелије у односу на контролне супстанце, и да ли испољавају цитотоксично дејство на здраве фибробласте.

2. Да буде утврђен тип ћелијске смрти (апоптоза и/или некроза и/или аутофагија) након третмана испитиваним супстанцама на туморским ћелијама.

3. Да експериментални резултати покажу да испитивани халкони индукују апоптозу активацијом унутрашњег пута повећањем експресије Вах-а и смањењем експресије Bcl-2 протеина уз последичну активацију каспазе-3.

Као најзанчајнији одговор очекујемо да резултати нашег истраживања допринесу даљем испитивању аналога халкона у *in vivo* истраживањима, као ефикасних потенцијалних антитуморских терапеутика.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Ова студија би требало да испита ефекат примењених аналога халкона на различите туморке ћелије хуманог порекла и здраве фибробласте. Студија би требало да утврди тип ћелијске смрти након третмана аналога халкона на туморске ћелије хуманог порекла, као и активност регулаторних протеина апоптозе укључених у унутрашњи апоптотски пут.

3. Предлог ментора

За ментора докторске дисертације под називом „Испитивање *in vitro* анти туморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла“ се предлаже Доц. др Ивана Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*. Доц. др Ивана Николић испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови доц. др Иване Николић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Nikolic I**, Andjelkovic M, Zaric M, Zelen I, Milosavljevic Z, Canovic P, Mitrovic M. Enhanced cytotoxicity and apoptosis by raloxifene in combination with estrogen and methotrexate in human endometrial stromal cells. *Chem Biol Drug Des.* 2018;91(4):885-892.
2. **Nikolic I**, Andjelkovic M, Zaric M, Zelen I, Canovic P, Milosavljevic Z, Mitrovic M. Induction of mitochondrial apoptotic pathway by raloxifene and estrogen in human endometrial stromal ThESC cell line. *Arch Med Sci.* 2017;13(2):293-301. DOI: 10.5114/aoms.2016.59874.
3. Kastratovic T, Arsenijevic S, Matovic Z, Mitrovic M, **Nikolic I**, Milosavljevic Z, Protrka Z, Sorak M, Duric J. Methotrexate and myotrexate induce apoptosis in human myoma fibroblasts (ThES cell line) via mitochondrial pathway. *Acta Poloniae Pharmaceutica.* 2015;72(3):455-464.
4. Zaric M, Mitrovic M, **Nikolic I**, Baskic D, Popovic S, Djudjevic P, Milosavljevic Z, Zelen I. Chrysin Induces Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes Isolated from Human Chronic Lymphocytic leukemia. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(2):189-195.
5. Stojkovic DLj, Jevtic VV, Radic GP, Todorovic DV, Petrovic M, Zaric M, **Nikolic I**, Baskic D, Trifunovic SR. Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-

benzyl))-acetic acid. Journal of Inorganic Biochemistry. 2014;143:111-6.

6. **Nikolic I**, Kastratovic T, Zelen I, Zivanovic A, Arsenijevic S, Mitrovic M. Cytosolic pro-apoptotic SPIKE induces mitochondrial apoptosis in cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2010;395(2):225-31.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална биохемија.

5. Научна област чланова комисије

1. Доц. др **Марија Анђелковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, председник;

2. Проф. др **Зоран Ратковић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Органска хемија*, члан;

3. Доц. др **Јелена Башић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Биохемија*, члан;

4. Доц. др **Милан Зарић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, члан;

5. Доц. др **Петар Чановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, члан;

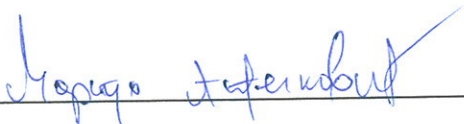
Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности, кандидат Јован Луковић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита антитуморски ефекат и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла.

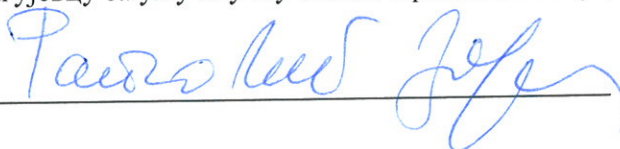
Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Јована Луковића, под називом „ Испитивање *in vitro* антитуморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла “ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

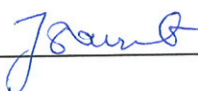
1. Доц. др Марија Анђелковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник;



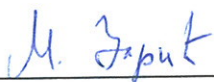
2. Проф. др Зоран Ратковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, члан;



3. Доц. др Јелена Башић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Биохемија, члан;



4. Доц. др Милан Зарић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;



5. Доц. др Петар Чановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;

