

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПРИЈЕМ		1.9.09.2023	
Орг. јед.		Број	Вредност
05	9344		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 14.06.2023. године, одлуком број IV-03-423/31 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова“ кандидата Невене Лазаревић, у следећем саставу:

1. **др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **др Биљана Љујић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Генетика*, члан;
3. **др Небојша Кладар**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, за ужу научну област *Фармакогнозија и фитотерапија*, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Невене Лазаревић и подноси Наставно-научном већу следећи

2. Извештај комисије о оцени и одбрани завршене докторске дисертације

2.1. Опис докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Невене Лазаревић под називом „Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова“, урађена је под менторством доц. др Исидоре Милосављевић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска биотехнологија*.

У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је на јасан и прецизан начин и цитирајући релевантну литературу изложила релевантне информације које се односе на етимологију, карактеристике, распрострањеност биљне врсте *M. officinalis*, фитохемију, традиционалну употребу и фармакотерапијска својства *M. officinalis*. Такође, кандидат је објаснила и етиологија и епидемиологија миокардитиса, клиничку слику и дијагнозу

миокардитиса, анималне моделе аутоимунског миокардитиса, као и фитотерапијски приступ у лечењу и превенцији аутоимунског миокардитиса.

Циљеви и хипотезе истраживања јасно су изложени и дефинисани у складу са одобреним приликом пријаве тезе. Циљ ове студије био је да се испита утицај примене екстракта *Melissa officinalis* на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса (ЕАМ) код пацова.

Материјал и методе рада су прецизно формулисани и подударају се са одобреним приликом пријаве тезе. Како би се идентификовао екстракт МОЕ са потенцијално најбољим кардиопротективним ефектом, прво су хемијски окарактерисани водени и етанолни МОЕ, а потом испитан и њихов антиинфламацијски и антиоксидациони потенцијал. На основу тога одабран је етанолни екстракт под рефлуксом за даље истраживање. Други део истраживања спроведен је на 80 Dark Agouti пацова подељених у 10 група у зависности од тога да ли су животиње здраве или им је индукован ЕАМ, од примењене дозе МОЕ (50, 100 и 200 mg/kg) и дужине третмана (3/6 недеља). ЕАМ је индукован имунизацијом пацова миозином 0. дана протокола. Хемодинамски параметри праћени су 0., 21. и 42. дана. Након завршеног протокола животиње су жртвоване, прикупљени су узорци крви за одређивање различитих биохемијских параметара и изолована су срца у циљу патохистолошких анализа, и анализе релативне експресије гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију.

Третман МОЕ побољшао је функцију и морфологију миокарда, у акутној и хроничној фази ЕАМ (смањење инфламаторног инфилтрата, колагених влакана и апоптотских ћелија у ткиву миокарда уз побољшање хемодинамских параметара). Механизми постигнутих ефеката највероватније подразумевају синергију антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских својстава МОЕ. Ова студија сугерише да МОЕ, посебно у дози од 200mg/kg, побољшава функцију и архитектуру миокарда у ЕАМ, чиме се спречава ремоделовање срца и развој дилатативне кардиомиопатије. Стога се МОЕ могу сматрати потенцијално корисном адјувантном терапијом код пацијената са аутоимунским миокардитисом.

У поглављу „Дискусија“ детаљно су објашњени резултати истраживања, коментарисањем у односу на резултате претходно објављених истраживања.

2.2. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Melissa officinalis (МО) се сматра одличним извором широког спектра активних хемијских једињења присутних како у листовима, тако и у етарском уљу, укључујући полифенолна, флавоноидна и терпенска једињења. Бројна истраживања идентификовала су неколико главних полифенолних киселина у екстрактима матичњака, присутних у различитим односима. Сматра се да је главни и најзаступљенији активни састојак розмаринска киселина, која је одговорна за бројне, по здравље корисне ефекте матичњака. Уз розмаринску киселину присутне су и: кафена, хлорогена, циметна, гална, протокатехична, гентизинска, р-кумаринска, ферулна, салвианолна и елагична киселина.

Резултати бројних студија указују на различите фармаколошке ефекте матичњака као што су седациони и благи хипнотички, хипогликемијски, хепатопротективни, антибактеријски, антивирусни, спазмолитички и неуропротективни. Једињења заступљена у МО поседују способност везивања за рецепторе за ацетилхолин као и инхибиције ензима ацетилхолинестеразе што последично доводи до побољшања когнитивних способности функције као што је меморија. Поред тога, истраживачи истичу да МОЕ може превенирати неуродегенеративне поремећаје који су повезани са оксидационим стресом као што су Паркинсонова и Алцхајмерова болест. Додатно, у литератури су описани повољни ефекти примене ове биљке на гликемију. Тако на пример, дневни унос у малим дозама побољшава толеранцију на глукозу и прилагођава експресију гена укључених у глуконеогенезу у јетри. Многобројни докази спроведених истраживања говоре у прилог тврдњи да матичњак, а нарочито екстракти матичњака делују као чистачи слободних радикала и издвајају ову биљку као значајан природни извор антиоксидационих једињења. С обзиром да оксидациони стрес посредује у патогенези многобројних акутних и хроничних болести попут кардиоваскуларних, неуродегенеративних, метаболичких, карцинома и других, од круцијалног је значаја проналажење и употреба потентних и безбедних антиоксиданаса природног порекла. Постоји неколико основних механизма дејстава антиоксиданаса и то: деловање као редукциони агенси, чистачи слободних радикала, потенцијални хелатори прооксидационих метала и као неутрализатори синглетног кисеоника.

Велики антиинфламаторни потенцијал *M. officinalis* екстракта је очекиван јер је састављен од мешавине биоактивних једињења за које је познато да делују антиинфламаторно у различитим стањима. До сада је потврђен *in vivo* антиинфламаторни потенцијал етарског уља и воденог екстракта матичњака коришћењем модела карагенином индикованог едема шапице пацова. Доказано је да примена екстракта матичњака може деловати антиинфламаторно у различитим патологијама, смањењем продукције проинфламаторних цитокина IL1, IL6, TNF- α .

Узевши у обзир добро позната својства МО на рад срца и дугогодишњу традиционалну употребу у сврху лечења палпитација, предмет великог броја истраживања (*in vitro*, *in vivo*, и *ex vivo*) био је испитивање кардиопротективних ефеката ове биљке и њених екстракта у различитим кардиоваскуларним болестима, као и расветљавање могућих механизма који посредују у овим ефектима.

С обзиром да ефикасна и селективна терапија аутоимунског миокардитиса до данас не постоји, биљке и изоловани фитоконституенси се увелико истражују у *in vivo* моделима аутоимунског миокардитиса код глодара као потенцијално ефикасна антиинфламаторна терапија. Сходно томе, неколико фитоконституенаса је већ показало корисне ефекте у ублажавању ове болести у анималном моделу експерименталног аутоимунског миокардитиса попут кверцетина, ресвератрола, олеанолне киселине, хлорогене киселине, урсолне киселине, берберина, куркумина. Благотворни ефекти ових фитоконституенаса приписују се њиховим јаким антиоксидационим и антиинфламаторним ефектима.

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

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „Medline“ и „KoBSON“, уз коришћење одговарајућих кључних речи: *lemon balm*, *Melissa officinalis*, *extract*, *experimental autoimmune myocarditis*, *oxidative stress*, и *inflammation* нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Невене Лазаревић под називом „Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова“ представља резултат оригиналног научног рада.

2.4. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Мр фарм Невена Лазаревић (дев. Драгинић) рођена је 18.02.1993. у Крагујевцу, Република Србија. Завршила је Основну школу „Милутин и Драгиња Тодоровић“ и Другу крагујевачку гимназију као носилац дипломе „Вук Караџић“. Школске 2012/2013 уписала је Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Интегрисане академске студије фармације, а дипломирала је 12.07.2017. са просечном оценом 9,65 као добитник стипендије „Доситеја“ Фонда за младе таленте. Као учесник SEP програма провела је месец дана стручне праксе на Факултету Collegium medicum у Бидгошчу, Универзитет Никола Коперникус, Пољска. Септембра 2017. уписала је Докторске академске студије и од тада се активно бави научно истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију којом руководи проф. др Владимир Јаковљевић. Обавила је приправнички стаж и положила стручни испит пред комисијом Министарства здравља априла 2018. Од децембра 2018. запослена је као истраживач-приправник Министарства просвете, науке и технолошког развоја на Факултету медицинских наука, ужа научна област Фармацеутска биотехнологија. Јануара 2021. изабрана је у звање сарадника у настави, а од децембра 2021. носи звање асистента. Школске 2020/2021 уписала је специјалистичке студије Медицинске биохемије, Факултета медицинских наука. Тренутно је студент треће године Докторских академских студија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје – Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положила је све програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00, као и усмени докторски испит са оценом 10. Говори, чита и пише енглески језик (сертификат Ц1, Оксфорд академије страних језике) и одлично познаје рад на рачунару. Била је учесник више домаћих и међународних научних конгреса. У библиографији до сада има 30 радова објављених у целини, од којих је 24 са SCI листе.

Резултати рада наведени под редним бројем 1 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану докторске дисертације.

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

1. **Draginic ND**, Jakovljevic VL, Jeremic JN, Srejovic IM, Andjic MM, Rankovic MR, Sretenovic JZ, Zivkovic VI, Ljubic BT, Mitrovic SL, Bolevich SS, Bolevich SB, Milosavljevic IM. Melissa officinalis L. Supplementation Provides Cardioprotection in a Rat Model of Experimental Autoimmune Myocarditis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:1344946. **M21**
2. **Draginic N**, Andjic M, Jeremic J, Zivkovic V, Kocovic A, Tomovic M, Bozin B, Kladar N, Bolevich S, Jakovljevic V, Milosavljevic I. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Melissa officinalis Extracts: A Comparative Study. *Iran J Pharm Res.* 2022;21(1):e126561. **M23**
3. **Draginic N**, Jakovljevic V, Andjic M, Jeremic J, Srejovic I, Rankovic M, Tomovic M, Nikolic Turnic T, Svistunov A, Bolevich S, Milosavljevic I. Melissa officinalis L. as a Nutritional Strategy for Cardioprotection. *Front Physiol.* 2021;12:661778. **M21**

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

Спроведено истраживање у потпуности је усклађено са пријављеном темом докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија идентични су са одобреним у пријави тезе. Докторска дисертација кандидата Невене Лазаревић садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви и хипотезе, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Поглавље Литература садржи 311 цитираних библиографских јединица из иностраних и домаћих стручних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата Невене Лазаревић под називом „Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова“, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.6. Научни резултати докторске дисертације

1. Највиши принос екстракта матичњака добијен је коришћењем воде као растварача методом екстракције под рефлуksom.
2. Вода као растварач екстраховала је већи садржај флавоноида у односу на етанолне екстракте, док је насупрот томе већи садржај фенола забележен код етанолних екстраката.
3. HPLC-анализом показано је да је главни састојак испитиваних МОЕ розмаринска киселина, без обзира на примењену методу екстракције и коришћени растварач, са највећим приносом забележеним у етанолном МОЕ добијеним под рефлуksom. Поред ове компоненте, изоловане су и друге фенолне киселине (хлорогена, кафена, ферулна, транс-циметна киселина, р-кумаринска киселина, гална киселина) и флавоноиди (кверцетин).
4. Сви испитивани МОЕ показали су умерени антиоксидациони потенцијал *in vitro*, при чему је етанолни мацерат МО показао највећи капацитет неутрализације хидроксилних радикала и највећи потенцијал редукције гвожђа, док су етанолни и водени екстракти

добијени под рефлуksom показали већи потенцијал неутрализације DPPH радикала. Етанолни екстракти МО показали су већи потенцијал инхибиције липидне пероксидације.

5. Сва три испитивана МОЕ су успела да ублаже инфламаторну реакцију шапице индуковану карагенином, без дозно-зависних ефеката. Најизраженији антиинфламацијски ефекти забележени су у случају воденог екстракта у високој и средњој дози, и етанолног екстракта добијеног под рефлуksom у ниској и средњој дози.

6. Примена екстракта МОЕ утицала је на редокс статус пацова након карагенином индукованог едема шапице, у погледу смањења продукције прооксиданаса и појачане продукције антиоксиданаса, при чему су најизраженији ефекти забележени у случају примене воденог и етанолног екстракта под рефлуksom.

7. Тронеделна примена МОЕ ублажила је хемодинамске алтерације у акутној фази ЕАМ, у погледу побољшања ејекционе фракције и фракције скраћења, као и нормализације димензија леве коморе, уз изражен хипотензивни ефекат и негативни хронотропни ефекат у високој дози.

8. У хроничној фази ЕАМ, МОЕ третман није утицао на ејекциону фракцију и фракцију скраћења, као ни на крвни притисак и срчану фреквенцу, већ је доминантни ефекат у овој фази подразумевао смањење задебљања зидова леве коморе тј. спречавање хипертрофије миокарда и прогресије ЕАМ до ДКМ.

9. Тронеделна примена МОЕ ублажила је морфолошке промене миокарда изазване ЕАМ у акутној фази болести, у погледу смањења Hw/Vw односа, инфламаторног инфилтрата и депозиције колагена при чему је највиша доза МОЕ показала најбољи ефекат.

10. У хроничној фази ЕАМ, доминирала је појава фиброзе миокарда у односу на инфламацију карактеристично за ДКМ и увећање масе срца, а шестонеделни третман МОЕ у све три дозе је смањивао депозицију колагених влакана и фиброзу миокарда, уз смањење и инфламаторног инфилтрата на дозно-зависни начин. Висока доза МОЕ показале је најбоље ефекте на очување структуре миокарда.

11. Тронеделна примена МОЕ ублажила је оксидациони стрес у акутној фази ЕАМ и то кроз дозно-зависно снижење продукције прооксиданаса (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) и повећање продукције антиоксидантних молекула (SOD, CAT, GSH).

12. У хроничној фази ЕАМ, примена МОЕ постигла је сличне ефекте, али без утицаја на ниво H_2O_2 , NO_2^- , и без забележених дозно зависних ефеката. Додатно, у хроничној фази примена МОЕ повећала је релативну експресију антиоксидационих гена у миокарду.

13. У акутној фази ЕАМ, примена МОЕ модулирала је имунски одговор у погледу смањења системске продукције проинфламаторних Th1, Th2 и Th17 цитокина, и повећања продукције проинфламаторног цитокина IL-10, без забележених дозно зависних ефеката.

14. У хроничној фази, третман МОЕ ублажио је ослобађање свих мерених проинфламаторних цитокина изузев IL1. Додатно, хронични третман је успео да смањи продукцију IL17 системски, али и локално у миокарду смањењем експресије гена за IL17, као и Nf- κ B.

15. Третман МОЕ испољио је антиапоптотски ефекат и у акутној и у хроничној фази ЕАМ кроз смањење експресије проапоптског и повећање експресије антиапоптског гена у

миокарду, уз смањење броја ћелија одумрлих апоптозом у ткиву миокарда имунохистохемијски. Најбољи ефекти забележени су применом средње и високе дозе МОЕ.

16. Постигнути кардиопротективни ефекти МОЕ у акутној и хроничној фази ЕАМ могу се сматрати последицом комплексних синергистичких антиинфламацијских, антиоксидационих и антиапоптотских ефеката МОЕ.

17. У складу са резултатима ове студије, МОЕ се може сматрати одличним кандидатом за клиничку студију у којој би се испитивала ефикасност овог екстракта као адјувантне терапије код пацијената са аутоимунским миокардитисом.

2.7. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригиналан допринос разумевању ефеката примене екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) као фитотерапијског агенса у аутоимунском миокардитису.

2.8. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове студије публиковани су као оригинално истраживање у часописима индексираним на SCI листи (категорија M21 и M23).

1. **Draginic ND**, Jakovljevic VL, Jeremic JN, Srejovic IM, Andjic MM, Rankovic MR, Sretenovic JZ, Zivkovic VI, Ljubic BT, Mitrovic SL, Bolevich SS, Bolevich SB, Milosavljevic IM. *Melissa officinalis* L. Supplementation Provides Cardioprotection in a Rat Model of Experimental Autoimmune Myocarditis. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1344946. **M21**
2. **Draginic N**, Andjic M, Jeremic J, Zivkovic V, Kocovic A, Tomovic M, Bozin B, Kladar N, Bolevich S, Jakovljevic V, Milosavljevic I. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Melissa officinalis* Extracts: A Comparative Study. *Iran J Pharm Res*. 2022;21(1):e126561. **M23**

ЗАКЉУЧАК

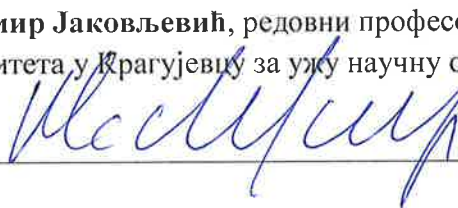
Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Невене Лазаревић под називом „Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова“, сматра да је истраживање у оквиру тезе базирано на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Невене Лазаревић, урађена под менторством доц. др Исидоре Милосављевић, даје оригинални допринос разумевању ефеката примене екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) као фитотерапијског агенса у аутоимунском миокардитису.

Комисија предлаже предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Утицај хроничне администрације екстракта матичњака (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*) на развој и прогресију експерименталног аутоимунског миокардитиса пацова“, кандидата Невене Лазаревић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник



др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу
за ужу научну област Генетика, члан



др Небојша Кладар, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за
ужу научну област Фармакогнозија са фитотерапијом, члан



У Крагујевцу, 31.08.2023. године