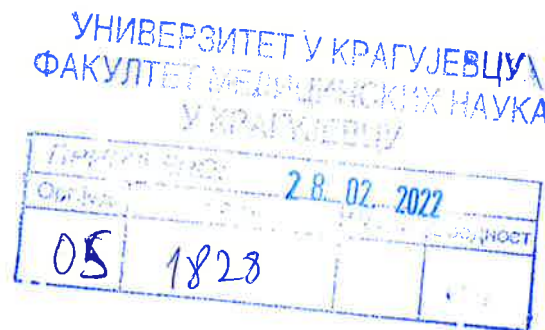


**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 19. 01. 2022. године, одлуком бр. IV-03-6/20 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Жељка Тодоровића под називом:

„Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *onosma visianii* на леукемијским лимфоцитима“, у саставу:

1. проф. др Гордана Радосављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија; председник;
2. проф. др Ненад Вуковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Биохемија, члан;
3. доц. др Оливера Тарабар, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Жељка Тодоровића и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

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

Докторска дисертација кандидата др Жељка Тодоровића под називом „Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *onosma visianii* на леукемијским лимфоцитима“ урађена под менторством проф. др Предрага Ђурђевића и проф. др Марије Миловановић, професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, представља оригиналну научну студију која се бави испитивањем антитуморске активности деривата шиконина изолованих из биљке *Onosma visianii in vitro*, коришћењем ћелијске линије мишије леукемије/лимфома и JVM-13 ћелијске линије хумане В-пролимфоцитне леукемије као и *in vivo* коришћењем експерименталног модела хроничне лимфоцитне леукемије.

Хронична лимфоцитна леукемија (CLL од енгл. *chronic lymphocytic leukemia*) је малигно лимфопролиферативно обољење које настаје пролиферацијом и акумулацијом

клона имунски некомпетентних али морфолошки зрелих В лимфоцита у костној сржи, другим органима и периферној крви. Дуго се сматрало да је CLL резултат клонске акумулације малигно трансформираних зрелих В лимфоцита који су резистентни на апоптозу, међутим новије студије показују да постоји и значајна пролиферација ћелија CLL и то доминантно у лимфним чворовима.

Пролиферација и резистенција CLL ћелија на апоптозу повезана је са активацијом више сигналних путева међу којима је и *signal transducer and activator of transcription molecules 3* (STAT3), па његова инхибиција представља једну од терапијских опција пацијената оболелих од CLL. STAT3 сигнални пут регулише експресију бројних гена који контролишу пролиферацију, диференцијацију, смрт и матичност ћелија. *In vitro* истраживања су показала да инхибиција STAT3 сигналног пута уводи туморске ћелије у апоптозу повећањем односа Bax/Bcl-2. Осим што регулише експресију антиапоптозоног Bcl-2 молекула, активирани STAT3 повећава експресију антиапоптозоног Mcl-1 молекула, а његова инхибиција уводи ћелије у апоптозу, смањујући ниво Mcl-1. Такође, STAT3 регулише ћелијску пролиферацију и инхибиција STAT3 зауставља ћелије у G1 фази ћелијског циклуса смањујући ниво циклина D1 и смањујући експресију гена за инхибиторе циклин зависних киназа, *Cdkn1a* и *Cdkn1b*. STAT3 учествује у онкогенези модулишући експресију тумор супресор гена *P53*. Фосфорилисани STAT3 инхибира експресију *P53*, чији продукт p53 протеин смањује транскрипцију гена одговорних за репликацију ДНК и пролиферацију ћелија са оштећеном ДНК. Гени ко што су *Nanog*, *Sox2* и *Oct4* су експримирани у туморским матичним ћелијама и имају улогу у пролиферацији и инхибирању диференцијације матичне ћелије. Показано је да активација STAT3 повећава експресију ових гена али и онкогена *c-Myc* који такође контролише транскрипцију гена експримираних у матичним ћелијама.

Шиконини су нафтахинонска једињења која се могу наћи у бројним биљкама коришћеним у традиционалној медицини. Досадашња истраживања показала су да шиконини стимулишу ткивну репарацију и имају антиинфламацијско, антимикуробно, антиоксидативно и антитуморско дејство. Антитуморско дејство демонстрирано је на ћелијским линијама и солидних тумора и леукемија. Механизам њиховог дејства је иницирање апоптозе туморских ћелија различитим механизмима укључујући инхибицију STAT3 сигналног пута.

С обзиром да CLL ћелије развијају резистенцију на све до сада коришћене хемотерапеутике и да новији приступи лечења CLL подразумевају примену модулятора сигналних молекула у овој студији је испитано потенцијално антитуморско дејство 2 деривата шиконина добијених из биљке *Onosma visianii* (*isobutyrylshikonin*, *α-methylbutyrylshikonin*) *in vitro* на BCL1 ћелијама мишије хроничне лимфоцитне леукемије и JVM-13 ћелијама хумане В-пролимфоцитне леукемије и антитуморски ефект *in vivo* у експерименталном моделу CLL.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оргиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „Medline“ и „CoBSON“, уз коришћење одговарајућих кључних речи: „*isobutyrylshikonin*“, «*α-methylbutyrylshikonin*», «STAT3», „*Onsoma visanii*“, и „*CLL*“ нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Жељка Тодоровића под називом „Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *onosma visanii* на леукемијским лимфоцитима“, представља резултат оргиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Др Жељко Тодоровић је рођен 16.11.1987. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу “Мулутин и Драгиња Тодоровић” у Крагујевцу, а потом је похађао Прву крагујевачку гимназију. 2007. године уписао је Медицински факултет, Универзитета у Крагујевцу који је завршио 2013. године са просечном оценом 9,89. Докторске академске студије уписао је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2013/2014. године изборно подручје Експериментална и клиничка интерна медицина. Од 2013. године до јануара августа 2017. године волонтирао је на Клиници за хематологију КЦ Крагујевац, а од августа 2017 је запослен на истој клиници. Од децембра 2014. године је запослен на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, прво као сарадник у настави а потом као истраживач приправник и истраживач сарадник на катедри за Интерну медицину. Звање специјалисте интерне медицине је стекао на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу маја 2021. године.

Б. Списак објављених радова

1. **Todorovic Z**, Milovanovic J, Arsenijevic D, Vukovic N, Vukic M, Arsenijevic A, Djurdjevic P, Milovanovic M, Arsenijevic N. Shikonin Derivatives from *Onsoma visanii* Decrease Expression of Phosphorylated STAT3 in Leukemia Cells and Exert Antitumor Activity. *Nutrients*. 2021;13(4):1147. **M21**
2. Mihaljevic O, Zivancevic-Simonovic S, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, **Todorovic Z**, Grujicic D, Radovic-Jakovljevic M, Tubic J, Markovic A, Paunovic M, Stanojevic-Pirkovic M, Markovic S. Apoptosis and genome instability in children with autoimmune diseases. *Mutagenesis*. 2018;33(5-6):351-357. **M22**
3. Ilic M, **Todorovic Z**, Jovanovic M, Ilic I. Burnout Syndrome Among Medical Students at One University in Serbia: Validity and Reliability of the Maslach Burnout Inventory-Student Survey. *Behav Med*. 2017;43(4):323-328. **M22**

2.4. 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

одобренем у пријави тезе. Докторска дисертација др Жељка Годоровића написана је на 69 страница и садржи следећа поглавља: увод, циљеви студије, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци и литература.

У уводном делу и теоретском разматрању написана су основна досадашња сазнања о етиологији, патогенези, клиничкој слици, дијагнози и лечењу хроничне лимфоцитне леукемије и В пролимфоцитне леукемије. Такође, описани су протективни ефекти различитих деривата шиконина у различитим патолошким стањима са посебним освртом на антитуморски ефекат. У завршном делу увода описани су механизми ћелијске смрти, контроле ћелијског циклуса и укратко наведен значај STAT3 сигналног пута.

Јано је постављен циљ (испитивање антитуморског дејства два деривата *shikonin*-а, добијених из биљке *Onosma visianii*, *in vitro* коришћењем BCL1 ћелијске линије мишје леукемије/лимфома и JVM-13 ћелијске линије хумане В-пролимфоцитне леукемије, као и *in vivo* коришћењем експерименталног модела CLL-е) и задаци (испитивање цитотоксичности деривата шиконина МТТ; испитивање релативног односа про- и анти-апоптотских молекула и активне каспазе 3 у леукемијским лимфоцитима излаганим дериватима шиконина; испитивање способности деривата шиконина да изазову апоптотску смрт леукемијских лимфоцита; испитивање утицаја биоактивних супстанци на ћелијски циклус и митотску активност ћелија BCL1 и JVM-13 ћелије; испитивање утицаја биоактивних супстанци на активност сигналног пута STAT3 у ћелијама BCL1 и JVM-13 ћелије; испитивање деловања деривата шиконина *in vivo* на анималном моделу CLL код BALB/с мишева мерењем релативне заступљености леукемијских лимфоцита у периферној крви и слезини) истраживања.

Материјал и методологија рада су истоветни са наведеним у пријави дисертације. Методологија рада је приказана прецизно и на одговарајући начин. Све технике коришћене у студији су детаљно описане.

Резултати истраживања су систематично приказани и документовани са 18 графикана и 4 табеле. Показано је да *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* изазивају поремећаје ћелијског циклуса и индукују апоптозу, инхибирају пролиферацију и смањују експресију фосфорилисане форме STAT3 и гена чију експресију контролише овај транскрипциони фактор у BCL1 и JVM-13 ћелијама. Испитивани деривати шиконина смањују проценат леукемијских ћелија у периферној крви и слезини мишева са CLL. Без између смањења експресије фосфорилисаног STAT3 у ћелијама третираним испитиваним дериватима шиконина и смрти BCL1 ћелија потврђена је детекцијом појачане смрти ћелија третираних и инхибитором Jak2 киназе. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* највероватније смањењем фосфорилације STAT3 индукују апоптозу, инхибирају ћелијску пролиферацију и атенуирају матичност леукемијских ћелија. Добијени резултати указују да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin*, уз додатна претклиничка испитивања, могу бити потенцијална терапија за хроничну лимфоцитну и В пролимфоцитну леукемију.

У поглављу Дискусија детаљно су анализирани добијени резултати истраживања и упоређивани са литературним подацима из исте области.

Коришћена литература је адекватна по обиму, садржају и релевантности.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Деривати шиконина изоловани из биљке *Onosma visianii*, *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin*, остварују значајан цитотоксички ефекат на ћелије мишије хроничне лимфоцитне леукемије, BCL1, и хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13. Ови деривати шиконина остварују значајан антипролиферативни ефекат, смањују активност STAT3 сигналног пута и индукују апоптотску смрт ћелија CLL и B-PLL. И *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* остварују значајан антитуморски ефекат *in vivo*, значајно смањујући проценат леукемијских лимфоцита у периферној крви и слезини третираних мишева, без пратећих значајних токсичних ефеката.

- *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* значајно смањују вијабилност BCL1 и JVM-13 ћелија.
- *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* смањују експресију антиапоптотских молекула Bcl-2 и MCL1, а повећавају експресију проапоптотских молекула Вах и Noxa и активне форме каспазе 3 што је праћено значајном апоптозом BCL1 и JVM-13 ћелија.
- *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* остварују антипролиферативни ефекат на леукемијске лимфоците. Мања експресија Ki-67 молекула и циклина D3, у BCL1 и JVM-13 ћелијама и мањи проценат ових ћелија у S фази ћелијског циклуса, а већа експресија инхибитора циклин зависних киназа p16, p21 и p27 се детектује у ћелијама третираним дериватима шиконина.
- Мањи проценат фосфорилисаног STAT3 молекула и смањена експресија молекула чију експресију регулише STAT3, с-Мус, циклина D3, NANOG и Sox2 (ниво РНК), детектују се у BCL1 и JVM-13 ћелијама третираним дериватима шиконина што указује да *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* инхибирају STAT3 сигнализацију у леукемијским ћелијама.
- *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* значајно смањују заступљеност CD5+CD19+ леукемијских ћелија у периферној крви и слезини у мишијем моделу CLL, без испољавања значајне токсичности.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања указују на значај даљих испитивања деривата шиконина као могућих нових антиканцерских лекова или као помоћних агенаса у терапији тумора.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове докторске дисертације објављени су до сада у једном оригиналном научном раду, у међународном часопису M21 категорије.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Жељка Тодоровића под називом „**Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *onosma visianii* на леукемијским лимфоцитима**“, сматра да је истраживање у оквиру тезе базирано на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Жељка Тодоровића, под менторством проф. др Предрага Ђурђевића и проф. др Марије Миловановић, представља оригинални научни рад и има научни значај због потенцијално новог терапијског приступа леукемији В лимфоцита.

Комисија предлаже предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „**Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *onosma visianii* на леукемијским лимфоцитима**“ кандидата др Жељка Тодоровића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

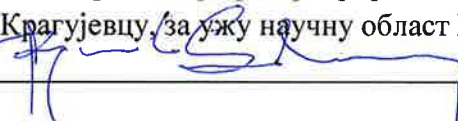
ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Гордана Радосављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија,

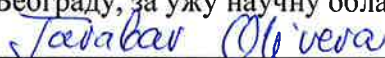
председник;



Проф. др Ненад Вуковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Биохемија, члан;



Доц. др Оливера Тарабар, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан.



У Крагујевцу, 14.02.2022. године