

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИЈАВљЕНО: 08.12.2021			
Оријед	Број	Издање	Вредност
05	14 332		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-888/22, од 10.11.2021. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Александра Кочовића**, под називом:

„Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

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

1. Доц. др **Мирослав Соврлић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска анализа, председник;
2. Доц. др **Невена Јеремић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан;
3. Проф. др **Перица Васиљевић**, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан.

На основу увида у приложеној документацији, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Александар Кочовић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Александар Кочовић рођен је 31. августа 1991. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу „Радоје Домановић“ у Крагујевцу као носилац дипломе „Вук Караџић“ и ђак генерације. 2006. године уписује Медицинску школу „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу. 2010. године осваја друго место на Републичком такмичењу из хемије. Носилац је дипломе „Вук Караџић“ и ђак је генерације за школску 2009/2010. годину. Од 2004. до 2010. године био је полазник Регионалног центра за таленте за област хемије, а од 2007. до 2010. године полазник у Истраживачкој станици Петница на семинарима хемије.

У јулу 2015. године дипломирао је на Интегрисаним академским студијама фармације, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, са дипломским радом: „Синтеза и карактеризација комплекса бакра(II) са S-алил дериватом тиосалицилне киселине“ и са просеком 9,90 (девет и 90/100) стекао звање магистра фармације. Током пете године студија био је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије „Доситеја“ и корисник стипендије „Драгослав Срејовић“ коју додељује град Крагујевац. Стручни испит за магистра фармације положио је 28.04.2016. године пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије.

Школске 2015/2016 године уписује докторске академске студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Студент је треће године докторских академских студија на изборном подручју Клиничка и експериментална фармакологија. Положио је све испите предвиђене програмом докторских академских студија са оценом 10. Усмени докторски испит положио је 26.06.2017. године са оценом 10. Био је корисник стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја која се додељује студентима докторских студија.

Од јула 2018. године ангажован је као истраживач на пројекту Министарства просвете, науке у технолошког развоја Републике Србије број ОИ 172015 под називом „Динамика нелинеарних физичко-хемијских и биохемијских система са моделирањем и предвиђањем њихових понашања под неравнотежним условима”.

Од 2017. године је запослен као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска анализа на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, а 2019. године изабран је у звање асистента за ужу научну област Фармацеутска анализа. Активно се бави наставним и научно-истраживачким радом. Аутор је и коаутор више научно-истраживачких радова у домаћим и страним часописима и учесник је већег броја домаћих и међународних научних конгреса.

Завршио је курс из области Истраживачка етика (Research Ethics) у организацији Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA. Одлично чита, пише и говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

Предмет: Фитохемијска карактеризација лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. Испитивање биолошке активности ацетонског, метанолног и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и упоређивање ефеката анализираних екстраката. Одређивање потенцијалних кардиопротективних ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Испитивање потенцијалног механизма настанка кардиопротективних ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине применом имунолошких и хистопатолошких анализа као и PCR анализе.

Хипотезе:

1. Хемијски састав ацетонског, метанолног и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* разликује се у квалитативном и квантитативном аспекту.
2. Ацетонски, метанолни и хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* имају различит садржај укупних фенолних једињења.
3. Ацетонски, метанолни и хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* имају различит садржај укупних флавоноидних једињења.
4. Ацетонски, метанолни и хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају различиту антиоксидациону активност.
5. Ацетонски, метанолни и хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају различиту антимикуробну активност.
6. Ацетонски, метанолни и хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају различиту антитуморску активност.
7. Одабрани екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* има значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
8. Уснинска киселина, као секундарни метаболит лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, има значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
9. Кардиопротекција индукована применом одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, подразумева модулацију оксидационог стреса, апоптозе и инфламације.
10. Кардиопротекција индукована применом уснинске киселине, као секундарног метаболита лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, подразумева модулацију оксидационог стреса, апоптозе и инфламације.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, је објавио 1 рад у целини у часопису категорије М51, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације:

1. **Коџовић А**, Kostić G, Savić D, Stanojević M, Milosavljević M, Janković S, Milosavljević M, Stefanović S. Factors Associated with the Occurrence of Death Outcome in Children with Neonatal Respiratory Distress Syndrome. Ser J Exp Clin Res. 2021;22(1): 51-7. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Лишајеви представљају заједницу два организма - гљиве (микобионт) и алге (фотобионт), који расту на високим планинама, пашњацима заједно са маховином, еруптивним стенама, земљишту, кори дрвећа, као и у шумама и воћњацима, а у тропским пределима и на листовима. У лишајевима је откривен велики број различитих органских једињења, од којих су нека специфична само за одређену врсту, па због тога имају врло важну улогу како у традиционалној медицини и фармацеутској индустрији, тако и у исхрани људи и животиња

Xanthoparmelia stenophylla. *Parmeliaceae* (синоними *Xanthoparmelia somloensis*, *Parmelia stenophylla* (Ach.) Heugel, *Parmelia conspersa subsp. stenophylla* Ach.) је космополитски лишај, који најчешће расте на добро осветљеној каменој подлози. Као главни састојци екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* идентификовани су салазинска и уснинска киселина.

Уснинска киселина је једињење карактеристичне дибензофуранске структуре и представља један од најчешће испитиваних секундарних метаболита лишајева. Најзаступљенија је у лишајевима из родова *Usnea* и *Xanthoparmelia* из фамилије *Parmeliaceae*. Узимајући у обзир да су досадашња истраживања потврдила њено антиоксидационо, антибактеријско, антигљивично и антитуморско дејство, претпоставља се да ће и овај лишај показати исту или сличну активност. Такође, ограничени литературни подаци сведоче о потенцијалном кардиопротективном ефекту уснинске киселине.

Због већ показаних биолошких ефеката и своје карактеристичне структуре претпоставља се да би одабрани екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина могли да испоље значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.

2.5. Значај и циљ истраживања

Лишај *Xanthoparmelia stenophylla* је врста која расте и на територији Републике Србије, па ће се овим истраживањем употпунити сазнања о ресурсима лишајева на територији Балкана. Посебан значај овог истраживања је у томе да, до сада, постоји мало података о хемијском саставу и биолошкој активности лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. Резултати овог истраживања омогућиће фитохемијску карактеризацију лишаја

Xanthoparmelia stenophylla, одређивање заступљености секундарних метаболита у различитим екстрактима, као и одређивање њихове биолошке активности. Пошто кардиопротективни ефекти уснинске киселине нису довољно истражени, биће од значаја да се испита ефикасност како одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, тако и саме уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Поред тога, резултати овог истраживања могли би да дају увид у потенцијалне механизме кардиопротекције.

Главни циљеви овог истраживања подразумевају фитохемијску карактеризацију екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као и испитивање ефеката администрације екстракта на функцију и морфологију миокарда у моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. У складу са главним циљевима, постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Фитохемијска карактеризација ацетонског, метанолног и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
2. Евалуација и компарација антиоксидационих ефеката ацетонског, метанолног и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
3. Евалуација и компарација антимикробних ефеката ацетонског, метанолног и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
4. Евалуација и компарација антитуморских ефеката ацетонског, метанолног и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
5. Евалуација и компарација кардиопротективних ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
6. Евалуација и компарација ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на редокс статус пацова којима је доксорубицином изазвана кардиотоксичност.
7. Испитивање потенцијалних механизма кардиопротекције изазване применом одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia*

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У лишајевима је откривен велики број различитих органских једињења, од којих су нека специфична само за одређену врсту, па због тога имају врло важну улогу како у традиционалној медицини и фармацеутској индустрији, тако и у исхрани људи и животиња

Лишај *Xanthoparmelia stenophylla* расте широм света, па тако и на Балканском полуострву и подручју Србије. Као главни састојци екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* идентификовани су салазинска и уснинска киселина, при чему су неки од ефеката ових једињења, као што су антиоксидациони, антибактеријски, антигљивични и антитуморски, већ описани у доступној литератури. Претпоставља се да ће и испитивани екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* показати сличну активност. Подаци о кардиопротективним ефектима уснинске киселине у постојећој литератури су ограничени па је други део истраживања фокусиран на испитивање кардиопротективног ефекта уснинске киселине и одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.

Кардиотоксичност подразумева оштећење срца које настаје услед деловања токсичних агенаса или лекова, а најчешће се карактерише кардиомиопатијом, срчаном инсуфицијенцијом и различитим облицима неправилног срчаног рада. Постоје бројни експериментални модели за изазивање кардиотоксичности, али се за испитивање потенцијалних кардиопротективних ефеката природних производа најчешће користи модел доксорубицином изазване кардиотоксичности. Овај цитостатик из групе антрациклинских антибиотика изазива кардиотоксичност највероватније услед комбинованог утицаја насталих реактивних кисеоничних врста (ROS), ослобађања азот монооксида, дисфункције митохондрија, нарушеног нивоа аденозин-трифосфата, поремећаја концентрације калцијума, аутофагије и ћелијске смрти. Управо због тога је модел доксорубицином изазване кардиотоксичности изабран у овој студији како би се испитали потенцијални кардиопротективни ефекти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија на биљном материјалу *in vitro*, на животињама *in vivo* и материјалу анималног порекла *in vitro* и *ex vivo*.

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање ће обухватати два дела: Фитохемијска карактеризација и испитивање антиоксидационе, антимицробне и антитуморске активности екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (1) и Испитивање кардиопротективног дејства одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине у моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности као и механизме индукованих ефеката (2).

Лишај *Xanthoparmelia stenophylla* који ће бити коришћен у овом истраживању биће прикупљен на подручју Старе Планине. Испитивање антиоксидационог потенцијала спровешће се коришћењем *in vitro* метода за одређивање садржаја укупних фенола, укупних флавоноида и антиоксидационог капацитета екстракта од интереса.

Одређивање антимицробне активности биће спроведено на више различитих бактеријских и гљивичних сојева коришћењем микродилуционе методе коришћењем ресазурина као индикатора.

Одређивање антитуморске активности биће спроведено коришћењем МТТ теста на различитим ћелијским линија хуманих карцинома.

У оквиру другог дела истраживања користиће се одрасли *Wistar albino* пацови мушког пола, старости 6-8 недеља, телесне масе 200-250 g. Све животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, циклус светлост:тама 12:12 часова), док ће вода и храна бити доступни у довољној количини да би животиње могле да их конзумирају према потреби (*ad libitum*).

Експерименти ће се спровести у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експерименталним процедурама.

2.7.3. Узорковање

Прикупљање лишаја ће се спровести по лепом и сунчаном времену. Након прикупљања, материјал ће бити очишћен од делова других биљака, песка, камења и осталих нечистоћа, а затим детерминисан од стране стручног лица и заведен под одређеним евиденционим бројем. Сушење узорака ће се обавити на промајном месту, у танком слоју, како би се узорци адекватно сачували и припремили за екстракцију. За потребе истраживања биће припремљено три екстракта: ацетонски, метанолни и хексански екстракт методом хладне мацерације како би се спречила евентуална термичка деградација изолованих секундарних метаболита. По завршеном поступку, добијени екстракти биће филтрирани у циљу отклањања нечистоћа из екстраката. Након филтрирања, растварач ће се упарити под сниженим притиском помоћу ротационог вакуум упаривача. Тако добијени суви екстракти биће коришћени за сва даља испитивања, а до употребе биће чувани на хладном месту заштићено од светлости.

Хроматографска анализа екстраката – хроматографија на танком слоју и течна хроматографија високих перформанси

У циљу одређивања квалитативног и квантитативног састава екстраката спровешће се прелиминарна анализа екстраката хроматографијом на танком слоју (TLC) применом процедура које су се показале као ефикасне у анализи секундарних метаболита лишајева (12). Након TLC анализе, сви екстракти биће анализирани и методом течне хроматографије високих перформанси (HPLC) под условима који су погодни за анализу секундарних метаболита лишајева, а подразумевају одговарајућу мобилну фазу, одговарајућу брзину протока мобилне фазе, одговарајући промер и дужину колоне и одговарајући адсорбент у колони. За анализу ће се користити суви екстракти који ће, пре извођења анализе, бити растворени у мобилној фази и профилтрирани.

Одређивање укупног фенолног садржаја

Укупни садржај фенолних једињења у испитиваним екстрактима биће одређен спектрофотометријски, употребом *Folin-Ciocalteu* реагенса. Метода се заснива на редукцији *Folin-Ciocalteu* реагенса до плаво обојеног јона под дејством феноксидног аниона који настаје дисоцијацијом полифенолних једињења присутних у испитиваним узорцима.

Укупни фенолни садржај ће бити изражен кроз mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта (mg GAE/g \pm SD).

Одређивање укупног садржаја флавоноида

Одређивање укупног садржаја флавоноида заснива се на грађењу комплекса флавоноида са $AlCl_3$. Апсорбанца се одређује на 415 nm у односу на слепу пробу, а као стандард користи се рутин. Укупан садржај флавоноида ће бити изражен кроз mg еквивалената рутина по g сувог екстракта (mg RE/g \pm SD).

Антиоксидационо деловање екстраката

Антиоксидациони потенцијал испитиваних екстраката биће одређен коришћењем различитих метода.

Одређивање укупног антиоксидационог капацитета

Укупан антиоксидациони капацитет екстраката биће одређен спектрофотометријски помоћу методе са молибден-фосфатом. Метода се заснива на редукцији молибден-фосфата (VI) до зеленог молибден-фосфата (V) од стране узорка. Као стандард биће коришћена аскорбинска киселина, а растварач (метанол) без узорка ће бити коришћен као слепа проба. Укупан антиоксидациони капацитет биће изражен кроз милиграм еквиваленте аскорбинске киселине по граму сувог екстракта.

Одређивање неутрализације DPPH радикала

Одређивање способности неутрализације DPPH[•] (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала ће се анализирати применом спектрофотометријске методе која је заснована на праћењу промене боје љубичасто обојеног раствора стабилног DPPH[•] радикала у редуковану, жуто обојену форму. Појава жуте боје објашњава се способношћу појединих компонената екстраката да делују као донори водоника или електрона, при чему DPPH[•] прелази у редуковани неутрални DPPH-H облик. Као референтни стандарди ће се користити аскорбинска киселина, гална киселина и бутилхидрокситолуен (BHT). Моћ неутралисања DPPH[•] радикала биће израчуната преко формуле:

$$\% \text{ Инхибиције} = \frac{A_k - A_c}{A_k} \times 100$$

A_k - апсорбанца контролног раствора; A_c - апсорбанца раствора узорка

За сваки узорак и сваку концентрацију анализа ће се спровести три пута. IC_{50} вредност (mg/ml), дефинисана као концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију DPPH[•] радикала за 50% биће добијена рачунски из једначине праве добијене линеарном регресионом анализом. Као стандарди ће се користити аскорбинска киселина и гална киселина.

Одређивање инхибиције липидне пероксидације

Степен инхибиције липидне пероксидације ће бити одређен тиоцијанатном методом. Ова спектрофотометријска метода анализе липидних пероксида се заснива на оксидацији феро до фери јона и накнадним грађењем комплекса са тиоцијанатима. Као стандарди ће се користити аскорбинска киселина и гална киселина.

Испитивање антимикробне активности екстраката

Антимикробна активност екстраката биће испитивана на више различитих бактеријских и гљивичних сојева. У *in vitro* одређивању антимикробне активности испитиваних екстраката биће коришћени стандардни сојеви бактерија *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* и *Bacillus subtilis* као и клинички изолати истих бактерија. Антифунгална активност екстраката ће се одређивати на два соја гљивица: *Candida albicans* и *Aspergillus niger*. Антимикробне активности екстраката ће бити испитане микродилуционом методом. Минималне инхибиторне концентрације (MIC) испитиваних екстраката биће одређене употребом микротитар плоча са 96 удубљења. Биће припремљена серија двоструких разблажења екстраката. Вредности минималних инхибиторних концентрација биће одређиване на основу промене боје у удубљенима, уз употребу ресазурина као индикатора, а промена боје биће детектована визуелно. Минимална микробицидна концентрација (MMC) биће одређена диск-дифузионом методом за екстракте који су испољили најниже

вредности MIC. Као позитивне контроле ће се користити тетрациклин и кетоконазол односно флуконазол.

Испитивање антитуморске активности екстракта

За истраживање ће се користити хумане туморске ћелијске линије различитог порекла и инвазивности: ћелијска линија карцинома дојке (MDA-MB 231), ћелијска линија карцинома колоне (HCT-116) и ћелијска линија карцинома цервикса (HeLa). Као здрава контрола користиће се нетрансформисана ћелијска линија фибробласта плућа (MRC-5).

Сви екстракти и уснинска киселина ће бити растворени у диметил-сулфокиду (DMSO), а радни раствори ће бити разблажени хранљивим медијумом који се користи за гајење ћелија неосредно пред експеримент, тако да финална концентрација DMSO-а у радним растворима не буде већа од 0,5% (v/v). Као позитивна контрола користиће се доксорубицин, припремљен на идентичан начин као и испитивани екстракти.

Дејство екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на вијабилност туморских ћелија и фибробласта одређиваће након 24h, 48h и 72h од третмана различитим концентрацијама испитиваних екстракта применом МТТ (X) теста. Сви резултати ће бити упоређени са ефектима доксорубицина. На основу резултата МТТ теста биће одређене вредности IC₅₀, као и индекс селективности (SI). Испитивање ће бити спроведено у три независна експеримента у квадрипликату.

Модел доксорубицином изазване кардиотоксичности

На основу хемијског састава екстракта, укупног садржаја фенолних и флавоноидних једињења, као и испољене антиоксидационе активности у *in vitro* условима биће одабран екстракт који ће се користити у делу истраживања који се односи на испитивање кардиопротективног дејства екстракта лишљаја заједно са дибензофуранским дериватом – уснинском киселином која представља један од најзаступљенијих секундарних метаболита у лишљајевима из фамилије *Parmeliaceae*.

Испитивање кардиопротективних ефеката на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

Испитивање кардиопротективних ефеката вршиће се на *Wistar Albino* пацовима, мушког пола, старости 6-8 недеља, телесне масе 200-250 g подељени у шест група:

1. Контролна група (CTRL), здраве животиње - без третмана (n=10),
2. Група животиња којима је доксорубицином (DOX) изазвана кардиотоксичност (n=10),
3. Група животиња третирана уснинском киселином (UA) у периоду од 28 дана (n=10),
4. Група животиња третирана уснинском киселином (UA + DOX) у периоду 28 дана, након којег им је доксорубицином изазвана кардиотоксичност (n=10),
5. Група животиња третирана одабраним екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (E), у периоду од 28 дана (n=10),
6. Група животиња третирана одабраним екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (E + DOX) у периоду 28 дана, након којег им је доксорубицином изазвана кардиотоксичност (n=10).

Доксорубицином изазвана кардиотоксичност подразумева да се животињама у интраперитонеални простор једнократно апликује доксорубицин у дози од 15 mg/kg.

Третман уснинском киселином подразумева пероралну примену уснинске киселине у облику раствора, у дози од 25 mg/kg.

Третман одабраним екстрактом подразумева пероралну примену одабраног екстракта у облику раствора, у дози од 125 mg/kg.

Истраживање ће имати два дела. Први део истраживања подразумева апликацију одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинске киселине и доксорубицина у унапред одређеним дозама, као и мерење хемодинамских параметара ехокардиографском методом пре и након терапије у свим експерименталним групама и у једнаким временским интервалима. Групама са здравим животињама и животињама третираним само доксорубицином ће током трајања истраживања перорално бити

апликован растварач у којима су растворени одабрани екстракт и уснинска киселина како би животиње у свим групама имале исти третман.

Други део истраживања подразумева *ex vivo* испитивање на изолованом срцу животиње. Након 72 часа од примене доксорубицина, животиње се најпре анестезирају, подвргавају се ехокардиографији, а затим се жртвују методом декапитације при чему се прикупљају узорци крви за остале предвиђене анализе. Након изоловања, срце животиње се перфундује методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimentaria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при променљивом коронарном перфузионом притиску од 40 до 120 cm воденог стуба. Након кардиодинамских истраживања узорци срца ће бити чувани на начин који одговара даљим испитивањима (редокс статус, хистолошка анализа и PCR анализа)

Све експерименталне процедуре ће се радити у складу за важећим актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и етичким принципима.

2.7.4. Варијабле

Испитивање функције срца in vivo

1. Ехокардиографијом (*Hewlett-Packard Sonas 5500, Andover, MA, USA*) ће се проценити структура и функционалност миокарда за сваку животињу нултог дана (на почетку експерименталног протокола) односно биће забележене промене у структури и функцији миокарда 31. дана, односно три дана након примене кумулативне дозе доксорубицина. Пратиће се следеће структурне варијабле:

- IVSd – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле
- LVIDd – унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле
- LVPWd – дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле
- IVSs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле
- LVIDs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле
- LVPWs – дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле ;
- LVFS – проценат фракционог скраћења леве коморе
- LVEF – ејекциона фракција леве коморе по следећој формули:

$$\bullet \quad EF = 100 \times \frac{(LVEDV - LVESV)}{LVEDV}; \quad LVESV = \frac{(7 \times LVIDs)}{(2.4 \times LVIDs)}; \quad LVEDV = \frac{(7 \times LVIDd)}{(2.4 \times LVIDd)}$$

2. Мерење крвног притиска и фреквенце срца животињама биће спроведено неинвазивном *tail cuff* методом коришћењем манжетне која се поставља на реп пацова и помоћу које се процењује системски крвни притисак (*MRBP-R IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA*).

Испитивање функције срца *ex vivo*

Један аспект кардиопротективних ефеката одабраног екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине био би испитан одређивањем кардиодинамских параметара методом по *Langendorff*-у. Након изоловања, срце животиње поставља се на уређај за перфундовање, док се у леву комору убацује сензор (*Transducer BS4 73-0184, Experimentaria Ltd, Budapest, Hungary*) који након стабилизације срца директно и континуирано прати параметре функције леве коморе:

- $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори
- $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори
- SLVP – систолни притисак леве коморе
- DLVP – дијастолни притисак леве коморе
- HR – срчана фреквенца

Вредност коронарног протока (CF) ће се одређивати флуометријски. Коронарни венски ефлуент ће бити прикупљан на различитим перфузионим притисцима у опсегу од 40-120 cmH_2O , а након стабилизације на притиску од 70 cmH_2O . За сваку тачку прикупљања ефлуента биће забележени и претходно наведени кардиодинамски параметри.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента ће спектрофотометријски бити одређивани биомаркери оксидационог стреса и то: индекс липидне пероксидације - мерен као садржај супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (TBARS), азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), водоник пероксид (H_2O_2) и супероксид анјон радикал (O_2^-).

Биохемијски параметри

На почетку експерименталног протокола животињама ће се узимати крв из ретроорбиталне вене, а на крају експерименталног периода животиње ће се жртвовати декапитацијом при чему ће се прикупити и узорак крви. Из оба прикупљена узорка одређиваће се ниво С-реактивног протеина (CRP) као и концентрације срчаних ензима: тропонина I (сTnI), креатин-киназе изоформа МБ (СК-МВ) и лактат-дехидрогеназе (LDH).

Маркери оксидационог стреса

Након завршеног експерименталног протокола приликом жртвовања животиња биће прикупљени узорци крви из којих ће поступком центрифугирања добити еритроцити и крвна плазма. Из прикупљене плазме ће се спектрофотометријски одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као садржај супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (TBARS), азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), водоник пероксид (H_2O_2) и супероксид анион радикал (O_2^-). Поред поменутих прооксидационих параметара, одређиваће се активност ензима антиоксидационог система заштите из лизата еритроцита: каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD), као и концентрација редукованог глутатиона (GSH).

Део ткива срца након *ex vivo* испитивања биће искоришћен за прављење хомогената срца где ће бити одређени сви већ поменути биомаркери оксидационог стреса и ензими антиоксидационог система заштите.

Маркери инфламације

Маркери инфламације ће се пратити коришћењем *ELISA* методе тј. одређиваће се концентрација цитокина који имају кључну улогу у патогенези кардиотоксичности и то цитокини карактеристични за Th1 и Th2 имунски одговор. Одређивање концентрације цитокина спровешће се у циљу процене антиинфламацијског ефекта конзумације екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на крају експерименталног протокола.

Реакција ланчане полимеразе (PCR)

Ткива миокарда намењена за PCR анализу, чуваће се на -80°C , до момента одређивања. За одређивање релативне експресије гена из узорака ткива миокарда се употребом TRIzol-а издваја информациона РНК. Употребом PCR методе уз коришћење одговарајућих прајмера пратиће се молекулски механизми којим примена екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине остварују ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Имајући у виду патогенезу доксорубицином изазване кардиотоксичности, пратиће се релативна експресија гена укључених у оксидациони стрес (SOD-1, SOD-2 и eNOS), апоптозу (Bax, Bcl-2, каспазе-3 и каспазе-9) и инфламацију (NFkB, TNF α , IL-6, IL-10 и IL-13).

Хистолошка анализа

Након завршетка експерименталног протокола, део изолованог срца експерименталних животиња биће фиксиран у 4% формалину пуферованом коришћењем фосфатног пуфера. Након фиксације ткиво миокарда се подвргава дехидратацији коришћењем растућих концентрација етанола, након чега се калупи у парафин. Калупи са узорцима ткива се микротомом секу на секције дебљине 4 μm након чега се боје различитим техникама. Хематоксилин/еозин бојење користиће се за процену инфламације, дегенерације и некрозе кардиомиоцита.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Укупан број експерименталних животиња биће одређен коришћењем софтвера G Power, а сам прорачун заснива се на резултатима претходно публикованих студија. За прорачун је коришћен двострани *t*-тест за везани узорак, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2)

На основу резултата досадашњих истраживања, укупан број експерименталних животиња *Wistar Albino* је прорачунат на 48. С обзиром да може доћи до искључивања неких експерименталних животиња из студије, укупан број животиња прерачунат је на 60.

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података спровешће се коришћењем софтверског пакета IBM *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS), верзија 22.0 за оперативни систем *Windows*. Процена нормалности расподеле спровешће се *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk* тестовима као и конструисањем хистограма и нормалног *QQ* графикана. У зависности од природе варијабле и нормалности расподеле података за испитивање постојања разлика међу групама користиће се одговарајући параметарски (Т-тест независних узорака, упарени Т-Тест, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе са одговарајућим *post hoc* тестовима) или непараметарски (Ман-Витнијев У-тест, Вилкоксонов тест, Краскал-Волисов тест) тестови. За поређење категоријских варијабли биће коришћени Хи-квадрат тест или Фишеров тест тачне вероватноће. За испитивање повезаности међу варијаблама биће коришћени Пирсонов или Спирманов тест корелације. Вредност $p < 0,05$ сматраће се статистички значајном.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће фитохемијска анализа екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* открити присуство састојака карактеристичних за породицу лишајева *Parmeliaceae*, са посебним нагласком на уснинској и салазинској киселини које припадају дибензофуранској односно депсидонској групи једињења. Такође, очекује се да ће различити екстракти испитиваног лишаја у зависности од врсте и количине активних састојака испољавати различиту биолошку активност. Поред тога очекује се да ће одабрани екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, али и уснинска киселина испољити кардиопротективно дејство на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Лишајеви представљају значајан биолошки извор секундарних метаболита веома различите хемијске структуре и биолошке активности. Главни идентификовани састојци лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* су у претходним истраживањима већ показали одређено антимикубно, антитуморско и антиоксидационо деловање, али су подаци о утицају на кардиоваскуларни систем и потенцијалном кардиопротективном деловању ограничени.

Након прикупљања лишаја, његовог пречишћавања и сушења направили би се различити екстракти коришћењем ацетона, метанола и хексана као растварача. Сви екстракти ће се комплетно фитохемијски окарактерисати и одредиће се њихова антиоксидациона, антимикуробна и антитуморска активност. На основу фитохемијске карактеризације и антиоксидационе активности одабраће се екстракт који ће се даље тестирати на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Планирано истраживање ће обухватити 60 пацова (*Wistar albino* сој, телесне масе 250 ± 20 g, старости 8 недеља) мушког пола који ће бити подељени у шест група на основу третмана. Након завршетка експерименталног протокола животиње се анестезирају и жртвују, а након жртвовања изолује се срце и узимају узорци крви. Изолована срца ће бити перфундована методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у. Вредности коронарног протока ће бити одређиване флоуметријски, а параметри функције леве коморе (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP и HR) биће континуирано праћени. Поред кардиодинамских параметара изоловано срце ће се користити за хистолошку и PCR анализу, док ће се у хомогенату ткива срца и венском ефлуенту спектрофотометријски одређивати параметри оксидационог стреса. Из крви ће се одређивати биохемијски параметри функције миокарда, параметри оксидационог стреса и параметри имунолошког одговора карактеристични за механизам настанка доксорубицином изазване кардиотоксичности.

Циљ првог дела овог истраживања је да се спроведе фитохемијска карактеризација различитих екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и да се испита њихова антиоксидациона, антимикуробна и антитуморска активност. Циљ другог дела овог истраживања је да се испитају ефекти одабраног екстракта лишаја и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, као и да се испитају потенцијални кардиопротективни механизми. Очекује се да ће одабрани екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина испољити кардиопротективно дејство на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, као и да ће се идентификовати механизам њиховог кардиопротективног дејства.

3. Предлог ментора

За коменторе ове докторске дисертације предлажу се проф. др Недељко Манојловић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска анализа и доц. др Јована Јеремић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија

Проф. др Недељко Манојловић и доц. др Јована Јеремић поседују стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњавају услове за коменторе докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1 Компетентност ментора

Радови проф. др Недељка Манојловића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Aoussar N, Achmit M, Es-Sadeqy Y, Vasiljević P, Rhallabi N, Mhand RA, Zerouali K, **Manojlović N**, Mellouki F. Phytochemical constituents, antioxidant and antistaphylococcal activities of *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and *Ramalina farinacea* (L.) Ach. from Morocco. Archives of Microbiology. 2021;203(6):2887-2894.
2. Aoussar N, Laasri FE, Bourhia M, **Manojlovic N**, Mhand RA, Rhallabi N, Ullah R, Shahat AA, Noman OM, Nasr FA, Almarfadi OM. Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020;2020:1-11.
3. **Manojlović NT**, Rančić AB, Décor R, Vasiljević P, Tomović J. Determination of chemical composition and antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of lichens *Parmelia conspersa* and *Parmelia perlata*. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021;15(1):686-96.
4. Tomović J, Kosanic M, Ranković BR, Vasiljević P, Najman S, **Manojlovic N**. Phytochemical analysis and biological activity of extracts of lichen *Physcia semipinnata*: as a new source of pharmacologically active compounds. Farmacia. 2019;67(2):346-353.

5. Kosanić M, Ristić S, Stanojković T, **Manojlović N**, Ranković B. Extracts of five cladonia lichens as sources of biologically active compounds. *Farmacia*. 2018;66(4):644-51.

Радови доц. др Јоване Јеремић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Jeremic JN**, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejsovic IM, Bradic JV, Milosavljevic IM, Mitrovic SL, Jovicic NU, Bolevich SB, Svistunov AA, Tyagi SC, Jeremic NS. Garlic Derived Diallyl Trisulfide in Experimental Metabolic Syndrome: Metabolic Effects and Cardioprotective Role. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9100.
2. Govoruskina N, Jakovljevic V, Zivkovic V, Milosavljevic I, **Jeremic J**, Bradic J, Bolevich S, Omarov IA, Djuric D, Radonjic K, Andjic M, Draginic N, Stojanovic A, Srejsovic I. The Role of Cardiac N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Heart Conditioning-Effects on Heart Function and Oxidative Stress. *Biomolecules.* 2020;10(7):1065.
3. Djuric M, Nikolic T, Kostic S, Radonjic K, **Jeremic J**, Petkovic A, Bradic J, Milosavljevic I, Srejsovic IM, Zivkovic VI, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anaesthetized wistar male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97:850-6.
4. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejsovic I, **Jeremic J**, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(2):111-120.
5. Cikiriz N, Milosavljevic I, Jakovljevic B, Bolevich S, **Jeremic J**, Nikolic Turnic TR, Mitrovic M, Srejsovic IM, Bolevich S, Jakovljevic V. The influences of chokeberry extract supplementation on redox status and body composition in handball players during competition phase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020;1-6.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална фармакологија

5. Научна област чланова комисије

1. **Доц. др Мирослав Соврлић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска анализа, председник;
2. **Доц. др Невена Јерemiћ**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан;
3. **Проф. др Перица Васиљевић**, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Александар Кочовић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Александра Кочовића, под називом: „Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Доц. др Мирослав Соврић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска анализа, председник



Доц. др Невена Јерemiћ, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан



Проф. др Перица Васиљевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и

биотехнологија, члан



У Крагујевцу, 24.11.2021. године