

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

**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 24.06.2015. године, одлуком 01-6526/3-8 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Милана Зарића под називом: „Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије“, у следећем саставу:

1. **Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник
2. **Доц. др Соња Мисирлић Денчић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан
3. **Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Милана Зарића и подноси Наставно-научном већу следећи извештај:

**ИЗВЕШТАЈ**

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

Докторска дисертација кандидата др Милана Зарића под називом „Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије“, урађена под менторством проф. др Иванке Зелен, ванредног професора Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, представља оригиналну студију која се бавила испитивањем промене вијабилности леукемијских лимфоцита у

присуству биоактивних супстанци, као и испитивањем ћелијских механизма који до тих промена доводе.

Хронична лимфоцитна леукемија (HLL) је малигно обољење хематопоезног ткива које настаје пролиферацијом и акумулацијом клона имунски некомпетентних В лимфоцита у костној сржи, лимфним жлездама, слезини и другим органима. Код овог обољења постоји прогресивна акумулација леукемијских ћелија која настаје не због убрзане пролиферације, већ због продуженог живота лимфоцита услед инхибиције апоптозе. Обзиром да поремећај апоптозе није уључен само у процес леукемогенезе, већ је повезан и са резистенцијом оболелих од HLL-а на стандардну терапију, потребно је наћи нове агенсе који би реактивирали апоптозу HLL лимфоцита.

Процес програмиране ћелијске смрти може бити започет спољашњим путем преко рецептора смрти или унутрашњим, митохондријалним сигналним путем када се ослобађа цитохром с из митохондрија. У оба случаја долази до активације ефекторске каспазе-3 и апоптозе. Сматра се да поремећај апоптозе може настати као резултат промењеног односа проапоптотичних и антиапоптотичних протеина. HLL лимфоците карактерише прекомерна експресија антиапоптотичних протеина Bcl-2 фамилије (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1). Прекомерна експресија Bcl-2 протеина, а пре свега повећање експресије Bcl-2 у односу на његов проапоптотични лиганд Вах, утичу на продужено преживљавање HLL лимфоцита. Различите врсте прополиса садрже флавоноиде који могу да индукују апоптозу малигнућ ћелија. Хризин, флавоноид присутан у прополису, индукује апоптозу појединих леукемијских ћелијских линија. Екстракти појединих биљака (*Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*) и гљива (*Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*) такође индукују апоптозу код неких туморских ћелијских линија. Ни за једну од ових супстанци није било познато како утиче на вијабилност HLL лимфоцита, нити на који начин делује на протеине који су важни за процес апоптозе HLL лимфоцита. Ова студија показује да хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећавају релативни однос Вах/Bcl-2, што доводи до транслокације цитохрома с из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије. На тај начин, показано је да хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* могу имати важну улогу у терапији хроничне лимфоцитне леукемије.

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

Претрагом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података "Medline" и "CoBSON" помоћу следећих кључних речи: Хронична лимфоцитна леукемија, биоактивне супстанце, апоптоза, хризин, прополис, *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* (CLL, bioactive compounds, apoptosis, chrysin, propolis, *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*) нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата др Милана

Зарића под називом „Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије“, представља резултат оригиналног научног рада.

### 2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

#### А. Лични подаци

Др Милан Зарић, сарадник у звању асистента за предмет Биохемија, запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу од 2008. године. Аутор је и коаутор 6 радова у часописима са рецензијом од чега су 3 рада публикована у часописима од међународног значаја. На пољу свог континуираног стручног усавршавања др Милан Зарић је био активни учесник на бројним међународним и регионалним конгресима посвећеним тематици у области хематологије и лабораторијских истраживања.

Од 2008. године др Милан Зарић је студент Докторских академских студија-изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, модул хематологија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Тема докторске дисертације под називом „Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије“, прихваћена је 2014. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Поседује активно знање енглеског језика и рада на рачунару.

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

Кандидат др Милан Зарић, остварио је 17,5 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

1. **Zaric M**, Mitrovic M, Nikolic I, Baskic D, Popovic S, Djurdjevic 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):189-95. (M22 - 5 бодова)
2. Conlon JM, Mechkarska M, Prajeep M, Arafat K, **Zaric M**, Lukic ML, Attoub S. Transformation of the naturally occurring frog skin peptide, alyteserin-2a into a potent, non-toxic anti-cancer agent. *Amino Acids.* 2013; 44(2):715-23. (M22 - 5 бодова)
3. Nikolic I, Mitrovic M, Zelen I, **Zaric M**, Kastratovic T, Stanojevic M, et al. Inhibitory role of monovalent ions on rat brain cortex adenylyl cyclase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013; 28(5):1061-6 (M23 - 3 бода)
4. Petrovic A, Nikolic I, **Zaric M**, Zelen I, Jovanovic D, Milosavljevic Z. et al. Serum deprivation induces apoptotic cell death In the THESC cell line. *Ser J Exp Clin Res* 2013; 14 (1): 23-28 (M52 - 1,5 бод)
5. Popovic S, Baskic D, Zelen I, Djurdjevic P, **Zaric M**, Arsenijevic N. The Cytotoxicity Of Korbazol Against Murine Cancer Cell Lines, *Ser J Exp Clin Res* 2012; 13 (2): 62-67 (M52 - 1,5 бод)

6. **Zarić M**, Mitrović M, Nikolić I, Popović S, Đurđević P, Baskić D, Zelen I. Ispitivanje aktivnosti superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze u plazmi i lizatima limfocita obolelih od hronične limfocitne leukemije. Med. čas. 2011; 45(2): 9-16 (M52 - 1,5 бод)

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

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду су остали исти. Примењена методологија истраживања је идентична са одобреном.

Докторска дисертација др Милана Зарића написана је на 125 страна и садржи следећа поглавља: увод, циљеве истраживања, материјал и методе, резултате, дискусију, закључак и литературу. Рад садржи 3 табеле, 5 слика и 36 графикана. Поглавље литература садржи 188 цитираних библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

У уводном делу кандидат сажето разматра садашњи ниво сазнања о испитиваној теми и о значају изабране теме за медицинску науку, затим истиче непознанице о теми и повезује их са темом свог рада. Јасно су изложени циљеви и конкретни задаци, при чему је основни циљ да се испита цитотоксичност две различите врсте прополиса, хризина и екстракта биљака *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium*, *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на леукемијским ћелијским линијама и лимфоцитима изолованим из крви пацијената оболелих од HLL-а, као и на моноклеарима изолованим из крви здравих особа (контрола).

Материјал и методологија рада су подударни са наведеним у пријави дисертације, презентовани су на одговарајући начин и врло прецизно. Детаљно су описане све технике коришћене у студији: ћелијске линије и популација која се испитује, узорковање, изолација лимфоцита и моноклеарних леукоцита, испитивање вијабилности ћелија, одређивање степена апоптозе, одређивање експресије протеина укључених у процес апоптозе, као и статистичке методе коришћене за анализу резултата.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани са 4 слике и 36 графикана. Показано је да хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, смањују вијабилност леукемијских лимфоцита индукцијом апоптозе, а не утичу на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита *in vitro* као и да прополиси и метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањују вијабилност леукемијских лимфоцита, али и здравих моноклеарних леукоцита. Поред тога, показано је да метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност ћелија леукемијских ћелијских линија MOLT-4 и JVM-13, али повећава вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне leukemije и здравих моноклеарних леукоцита. Хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећавају релативни однос Вах/Bcl-2, што доводи до транслокације цитохрома c из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне leukemije.

У поглављу Дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. Резултати су дискутовани у контексту сличних, различитих, па чак и конфликтних података о механизму деловања и ефекту које испитиване биоактивне супстанце испољавају на леукемијским, али и другим, туморским ћелијским линијама. При томе су наведени ставови из најзначајнијих оригиналних и ревијских научних радова поменуће области.

Литература је адекватна по обиму и садржају. Цитирано је 188 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, смањују вијабилност леукемијских лимфоцита, а не утичу на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита *in vitro*.
2. Прополиси и метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањују вијабилност леукемијских лимфоцита, али и здравих моноклеарних леукоцита.
3. Метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност ћелија леукемијских ћелијских линија MOLT-4 и JVM-13, али повећава вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије и здравих моноклеарних леукоцита.
4. Хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.
5. Хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећавају релативни однос Вах/Bcl-2, што доводи до транслокације цитохрома с из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.

## 2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати овог истраживања по први пут показују на који начин утичу хризин, прополиси, метанолски екстракт листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* и метанолски екстракти гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије. Показано је да хризин, метанолски екстракт листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* испољавају снажно и селективно антитуморско дејство на леукемијске лимфоците индукцијом апоптозе. Иако су додатна испитивања потребна и да би се прецизно и потпуно расветлио механизам укључен у процес смрти лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије коју индукује хризин, овај агенс има

обећавајућу улогу као будући хемотерапеутик у терапији хроничне лимфоцитне леукемије. Сличну улогу би могла имати молекулска компонента, једна или више њих, која је носилац биолошке активности метанолског екстракта листа биљке *Teucrium pollium*.

## **2.7. Начин презентирања резултата научној јавности**

Део истраживања ове докторске студије је објављен у часопису међународног значаја. Преостали део резултата истраживања, биће презентован у форми научних радова као оригинално истраживање у часописима од међународног значаја.

## **ЗАКЉУЧАК**

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Милана Зарића под називом **„Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије“**, на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим научним сазнањима и да је адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата др Милана Зарића урађена под менторством проф. др Иванке Зелен, представља оригинални научни рад и има велики научни и практични значај у разумевању дејства испитиваних биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, да докторска дисертација под називом **„Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије“**, кандидата др Милана Зарића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

## **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

**Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник

---

**Доц. др Соња Мисирлић Денчић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у  
Београду за ужу научну област Биохемија, члан

---

**Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

---

У Крагујевцу, 29.06.2015. године.