

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ВЕЋУ МЕНТОРА

ПРЕДМЕТ: ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Комисија за оцену завршене докторске дисертације кандидата Сузана Поповић, формирана на седници Већа ментора Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу од 19.12.08. у саставу:

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**; редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу за уже научне области: Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник комисије
2. **Доц. др Дејан Баскић**; доцент Медицинског факултета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, ментор
3. **Др. сци. Љиљана Вучковић-Декић**, научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије, члан
4. **Проф. др Драган Миловановић**, ванредни професор Медицинског факултета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан
5. **Доц. др Михајло Јаковљевић**, доцент Медицинског факултета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија, члан

разматрала је докторску дисертацију под називом „**Испитивање механизма дејства *Nakwonit-a* и *Korbazol-a***“ кандидата мр Сузана Поповић.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију мр Сузана Поповић и подноси Већу Ментора следећи

ИЗВЕШТАЈ

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

Радна верзија садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија и Закључци.

У УВОДНОМ делу и теоретском разматрању кандидат је кратко, јасно и прецизно, користећи најсавременије литературне податке, изложио савремена сазнања о процесу програмиране ћелијске смрти, апоптози, уз истицање најзначајнијих сигналних путева који уводе ћелију у апоптозу, као и о дерегулацији контролних механизма апоптозе у малигним ћелијама. Сlike које су коришћене у поглављу Увод преузете су из публикованих радова и књига.

У другом поглављу јасно је изложен ЦИЉ истраживања и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљем: да се утврди да ли је апоптоза индукована природним производима *Nakwonitom* и *Korbazolom* каспаза-зависна и ако јесте које су каспазе ангажоване, да ли ангажовани сигнални путеви укључују промену интрацелуларне концентрације Ca^{2+} , да ли испитиване супстанце остварују своје цитотоксично дејство преко повећања продукције азот монооксида и слободних радикала и да ли ове супстанце утичу на активност антиоксидативних ензима.

МЕТОДОЛОГИЈА рада је врло прецизно и јасно изнесена. Студија је спроведна на лимфоцитима периферне крви оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије код којих хе дијагноза потврђена на основу клиничких, лабораторијских и имуно-фенотипских параметара. У неким експериментима су, као контрола, коришћени лимфоцити периферне крви здравих испитаника. У поглављу Материјал и методе детаљно су описане лабораторијске методе које је кандидат користио у истраживању. Општи протокол по коме је испитивање урађено јасно је наведен. Из периферне крви којој је додат антикоагуланс на густинском градијенту су изоловани леукоцити. Леукоцити су култивисани са *Nakwonit*-ом и *Korbazol*-ом у *in vitro* условима у медијуму RPMI 1640 уз предходну инкубацију са различитим модулаторима апоптозе, а затим је вијабилност ћелија утврђивана МТТ тестом. Осим тога, извршено је мерење параметара оксидативног стреса у културама и лизатима ћелија третираних испитиваним супстанцама.

РЕЗУЛТАТИ истраживања су јасно и детаљно изнети и веома добро документовани великим бројем табела и графика. Добијени резултати су статистички обрађени кроз најсваременије статистичке показатеље и дају податке о компонентама и сигналним путевима апоптозе које ангажују испитиване супстанце. Наиме, утврђено је да је тип ћелијске смрти које изазивају *Nakwonit* и *Korbazol* апоптоза и да је њихово цитотоксично дејство селективно, дозно и временски зависно. Апоптоза индукована испитиваним супстанцама је каспаза-зависна, а иницијаторске каспазе које су ангазоване су каспазе-2 и -4 чија је активација везана за стрес ендоплазматског ретикулума. Утврђена је и мобилизација Ca^{2+} из интрацелуларних депоа, што потврђује учешће стреса ендоплазматског ретикулума као компоненте индуковане апоптозе. Даље, утврђено је да испитиване супстанце повећавају оксидативни стрес и то тако што инхибирају активност антиоксидативних ензима супероксид дизмутазе и глутатион пероксидазе.

ДИСКУСИЈА обухвата анализу добијених резултата и пореди их са литературним подацима из ове области. У овом поглављу кандидат излаже развој нових стратегија у терапији канцера која ће искористити промењену експресију или мутације гена који кодирају кључне апоптотичне протеине и на тај начин селективно, циљано, убијати малигне ћелије. Цитирајући референце из савремене светске литературе кандидат указује на чињеницу да су малигне ћелије под сталним оксидативним стресом који је повезан са онкогеном трансформацијом, променама у метаболичкој активности и повећаном продукцијом реактивних кисеоничних врста (ROS). У условима благог оксидативног стреса ћелија је способна да га превазиђе уз помоћ различитих адаптационих механизма. Један од њих је повећана експресија антиоксидативних ензима као што су SOD, каталаза и пероксидазе. У малигним ћелијама ови адаптивни механизми имају ограничен капацитет, па у условима продуженог оксидативног стреса може доћи до исцрпљивања антиоксидативне заштите. Зато егзогени агенси који повећавају продукцију ROS могу повећати оксидативни стрес до тачке од које се покреће ћелијска смрт. Малигне ћелије су у односу на нормалне ћелије више зависне од антиоксидативне заштите, па је логично да ће апоптозу, као резултат додатног оксидативног стреса, изазвати агенси који повећавају продукцију ROS у малигној ћелији, инхибитори антиоксидативних ензима или комбинација оба. Пошто нормалне ћелије имају ниже нивое ROS и задржавају већи антиоксидативни капацитет, агенси који доводе до акумулације ROS убијаће претежно малигне ћелије. Резултати овог истраживања јасно су показали да *Nakwonit* и *Korbazol* делују тако што инхибирајући антиоксидативне ензиме, супероксид дизмутазу и глутатион пероксидазу, доводе до

повећања количине слободних радикала у ћелији. Пошто су малигни лимфоцити хроничне лимфоцитне леукемије под сталним оксидативним стресом, додатни оксидативни стрес доводи до покретања програма апоптозе. Слободни радикали индукују стрес ендоплазматског ретикулума, а последице су мобилизација Ca^{2+} и активација каспаза-2 и -4 које покрећу каскаду каспаза, протеаза које имају централну улогу у програму апоптозе.

На основу дискусије добијених резултата кандидат изводи ЗАКЉУЧКЕ који дају одговоре на постављене циљеве и хипотезе:

1. *Nakvonit* и *Korbazol* испољавају селективно цитотоксично дејство
2. Цитотоксични ефекат *Nakvonita* и *Korbazola* расте са повећањем дозе испитиваних супстанци и времена инкубације
3. Тип ћелијске смрти који индукују *Nakvonit* и *Korbazol* је апоптоза
4. Цитотоксично дејство *Nakvonita* и *Korbazola* не захтева *de novo* синтезу протеина
5. Апоптоза индукована *Nakvonitom* и *Korbazolom* је каспаза-зависна
6. У путевима апоптозе индуковане *Nakvonitom* и *Korbazolom* ангажована је ефекторска каспаза-3
7. *Nakvonit* и *Korbazol* не изазивају апоптозу ангажовањем каспазе-8 и -9, нити индукују ослобађање цитохрома ц из митохондрија, али укључују активацију каспаза-2 и -4
8. *Nakvonit* и *Korbazol* индукују повећање интрацелуларне концентрације Ca^{2+} али не путем стимулације уласка Ca^{2+} из ванћелијског простора, већ ослобађањем из интрацелуларних депоа
9. *Nakvonit* и *Korbazol* повећавају концентрацију малонилдиалдехида и водоник пероксида, али не и азот монооксида
10. *Nakvonit* и *Korbazol* инхибирају активност супероксид дизмутазе и глутатион пероксидазе, док на активност каталазе и глутатион С трансферазе немају утицаја

СПИСАК ПУБЛИКОВАНИХ РАДОВА МР СУЗАНЕ ПОПОВИЋ

Магистарска теза:

1. "Системске болести везивног ткива: фагоцитоза апоптотичних ћелија". Медицински факултет, Универзитет у Крагујевцу, 2005.

Радови публиковани у целини:

2. Đurđević P, Arsenijević NN, Baskić D, Đukić A, **Popović S**, Samardžić G. Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol* 2001; 6(3):159-166.

3. Dejan Baskic, Ljubisa Acimovic, Aleksandar Djukic, Predrag Djurdjevic, **Suzana Popovic**, Biljana Milicic, Itana Labovic and Nebojsa N. Arsenijevic. Phagocytic Activity and Nitric Oxide Production of Circulating Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Peritoneal Carcinomatosis. *Acta Oncologica* 2003;42(8):1-6.

4. N. Arsenijevic, D. Baskic, **S. Popovic**, P. Ristic, L. Acimovic. Preliminary study of mononuclear phagocytosis during breast cancer therapy. *Journal of BUON* 2005; 10: 105-109.

5. Baskic D, **Popovic S**, Ristic P, Arsenijevic NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int.* 2006 Jul 5

6. **S Popovic**, N Arsenijevic, D Baskic. *In vitro* assay for the quantitative measurement of apoptotic lymphocytes phagocytosis by peripheral blood monocytes. *Acta Physiologica Hungarica* 2006; 93: 325-333
7. Sorak M, Arsenijevic S, Lukic G, Arsenijevic N, Ristic P, Pavlovic S, **Popovic S**, Baskic D. Relationship of serum levels of tumor markers with tissue expression of gene products in ovarian carcinoma. *Journal of BUON* 2007 Jan-Mar;12(1):99-104.
8. Baskic D, Ristic P, Matic S, Bankovic D, **Popovic S**, Arsenijevic N. Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer. *Biomarkers*. 2007 Jul 12;:1-11.
9. Zivadin D. Bugarcic, Biljana Petrovic, Zorica M. Bugarcic, Slobodan M. Jankovic, Snezana V. Jankovic, Goran Lukic, Milan Novakovic, Vladimir Kostovic, **Suzana Popovic**, Predrag Djurdjevic, Dejan Baskic, Nebojsa Arsenijevic. Effects of cisplatin and other Pt(II) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct. *Toxicology in Vitro* 2008; 22:1878-1882.
10. Ђурђевић П, Баскић Д, Ђукић А, **Поповић С**, Јаковљевић В, Арсенијевић Н. Фагоцитна активност леукоцита периферне крви током акутног инфаркта миокарда. *Мед Прегл* 2003;ЛВИ(Суппл 1):97-102.
11. Dejan Baskic, Gordana Radosavljevic, Vesna Cokanovic, Ilija Jevtic, Ivanka Zelen, **Suzana Popovic**, Snezana Pavlovic and Nebojsa Arsenijevic. Serum levels of NO, IL-18 and MDA in patients with breast carcinoma. *Medicus* 2005; 6(2): 62-65.
12. Predrag Djurdjevic, Ivanka Zelen, Petar Ristic, Ivan Jovanovic, Vladimir Jakovljevic, Dejan Baskic, **Suzana Popovic** and Nebojsa Arsenijevic. Oxidative stress markers in chronic lymphocytic leukemia. *Medicus* 2006; 7(2):52-56.
13. Nemanja Zdravković, Sladjana Pajović, Gordana Radosavljević, Dušica Zdravković, Ivan Jovanović, **Suzana Popović**, Dejan Baskić, Slobodan Zdravković, Nebojša Arsenijević. Reducing the phagocytic ability of monocytes in patients with multiple sclerosis. *Ser J Exp Clin Res* 2008; 9(3): 89-92.

Презентације са конгреса штампане као абстракти:

14. Љ. Аћимовић, Г. Самарцић, **С. Гајовић**, С. Н. Арсенијевић, М. Кнежевић, Н.Н. Арсенијевић. Имунохистохемијска анализа нумеричких односа Б и Т лимфоцита у бенигним и малигним туморима дојке. *Зборник резимеа XXIII октобарских здравствених дана*, Крагујевац, 1994.
15. Н.Н. Арсенијевић, Љ. Аћимовић, Г. Самарцић, **С. Гајовић**, С. Н. Арсенијевић, М. Кнежевић. Фенотипске карактеристике ТИЛ-Т у бенигним и малигним неоплазијама дојке. *Зборник резимеа XXII октобарских здравствених дана*, Крагујевац, 1994.
16. Ђурђевић П, **Поповић С**, Баскић Д, Арсенијевић Н, Самарцић Г. Дефинисање поступка обраде хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви после одмрзавања. *XXIV октобарски здравствени дани*, Крагујевац, 24-25 октобар 1996; *Зборник сажетака*, 72
17. Баскић Д, Ђурђевић П, **Поповић С**, Арсенијевић Н, Самарцић Г. Утицај генератора и проводника топлоте на криоконзервацију хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви. *XXIV октобарски здравствени дани*, Крагујевац, 24-25 октобар 1996; *Зборник сажетака*, 73.
18. **Поповић С**, Ђурђевић П, Баскић Д, Арсенијевић Н, Самарцић Г. Дефинисање криопротектора и медијума за криоконзервацију хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви. *XXIV октобарски здравствени дани*, Крагујевац, 24-25 октобар 1996; *Зборник сажетака*, 74.

19. Ђурђевић П, Баскић Д, **Поповић С**. Утврђиване основних услуга обраде хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви после одмрзавања. 39. *Конгрес студената медицине и стоматологије Југославије*, Нови Сад, 1997; Зборник сажетака, 153.
20. Баскић Д, **Поповић С**, Ђурђевић П. Ефекат динамике промене температуре на криоконзервацију хуманх мононуклеарних ћелија периферне крви. 39. *Конгрес студената медицине и стоматологије Југославије*, Нови Сад, 1997; Зборник сажетака, 153.
21. Djurdjevic P., Arsenijevic N.N., Djukic A., Radivojevic S., Vuckovic Z., Baskic D., **Popovic S.**, Bajovic Lj., Miloradovic M., Vuckovic M., Samardzic. Correlation between phagocytic activity peripheral blood polymorphonuclear cells and serum-time activities of the enzymatic markers of myocytes necrosis in patients during acute myocardial infarction. 11th Congress of the Mediterranean association of Cardiology and Cardiac Surgery; Montpellier France, 1998
22. Arsenijevic N.N., Djurdjevic P., Djukic A., Baskic D., **Popovic S.**, Miloradovic M., Vuckovic M., Samardzic G. Phagocytic activity of peripheral blood mononuclear cells in patients during acute myocardial infarction. 11th Congress of the Mediterranean association of Cardiology and Cardiac Surgery; Montpellier France, 1998
23. Ђурђевић П, Арсенијевић Н, Баскић Д, Вучковић М, Дјукић А, Ирић-Чупић В, **Поповић С**. Фагоцитна активност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви током акутног инфаркта миокарда. *Шести конгрес интерне медицине Југославије*, Београд, 12-15 новембар 2000; Зборник сажетака, 49.
24. Djurdjevic P, Baskic D, Arsenijevic N, Djukic A, **Popovic S**, Iric-Cupic V, Andjelkovic N, Vuckovic M, Jakovljevic V, Samardzic G Peripheral blood mononuclear cells phagocytosis during acute myocardial infarction. *Conference of the Serbian Physiological Society*, Zlatibor, december 20-23, 2001; *Acta Biol Med Exp* 2002; 27/1 (Supp.): 61.
25. Đurđević P, Baskić D, Đukić A, **Popović S**, Jakovljević V, Arsenijević N. Phagocytic activity of peripheral blood leukocytes during acute myocardial infarction. *Conference of the Serbian Physiological Society*, Belgrade-Zrenjanin, 7-9.11.2003; Abstract book, 144.
26. Arsenijevic NN, Ristic P, **Popovic S**, Jovanovic I, Jevtic A, Pavlovic S and Baskic D. Altered pattern of IFN-gamma, IL-18 and nitric oxide production in breast cancer at different clinical stage. The 3rd International Conference of Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, Prague, 2004, p14
27. Baskic D, Ristic P, **Popovic S**, Jovanovic I, Jevtic A, Pavlovic S and Arsenijevic NN. Supernatants from primary breast cancer tissue cultures induces IL-18 and nitric oxide, but not IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear cells invitro. The 3rd International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, Prague, 2004, p71.
28. Arsenijevic N, Baskic D, Ristic P, **Popovic S**, Jevtic A, Pavlovic S and Acimovic Lj. Relationship of serum HER-2, CA 15-3 and CA 125 in patients with breast cancer. 5th Congress of B.U.ON, Belgrade, 2004, p A-5.
29. Baskic D, Ristic P, **Popovic S**, Jevtic A, Pavlovic S and Acimovic Lj and Arsenijevic N. Significance of increased serum level of IFN-gamma, IL-18 and nitric oxide in breast cancer patients. 5th Congress of B.U.ON, Belgrade, 2004, p A-50.
30. **Popovic S**, Arsenijevic N, Delibasic Dj, Baskic D. In vitro assay for the quantitative measurement of phagocytosis of apoptotic lymphocytes by peripheral blood monocytes. The first congress of physiological sciences of Serbia and Montenegro with international participation, Belgrade, 2005, p151.
31. **Поповић С**, Делибасић Ђ, Баскић Д, Арсенијевић Н. Утицај терапије кортикостероидима на фагоцитну функцију мононуклеарних и полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви код оболелих од системских болести везивног ткива. В

научни састанак Удружења алерголога и клиничких имунолога Србије и Друштва имунолога Србије, Београд, 2007.

32. Ivan Jovanovic, Petar Ristic, **Suzana Popovic**, Snezana Matic, Gordana Radosavljevic, Dejan Baskic. Interferon-gamma, IL-18 and nitric oxide production in peripheral blood monocytes from breast cancer patients. TDK Konferencija, Szeged, 2007; p138.

33. Ђукић А, Живанчевић- Симоновић С, Дјурдјевић П, Баскић Д, Здравковић Н, Младеновић В, Јовановић И, **Поповић С**, Радосављевић Г, Арсенијевић НН. Ефекат пропилиптоурацила на функцију фагоцита периферне крви код особа са хиперфункцијом штитасте жлезде. XXXII Октобарски здравствени дани- сажеци радова, Медицински часопис 2007; 41(1) Suppl. 1: 19.

34. Здравковић Н, Ђукић А, Живанчевић- Симоновић С, Баскић Д, Младеновић В, Јовановић И, **Поповић С**, Дјурдјевић П, Радосављевић Г, Лукић М. Динамика промене биохемијских параметара гликорегулације током индукције малих, поновљених доза стрептозотоцина мишевима соја C57BL/6. XXXII Октобарски здравствени дани- сажеци радова, Медицински часопис 2007; 41(1) Suppl. 1: 22.

ОЦЕНА НАУЧНОГ ДОПРИНОСА И ОЦЕНА КАНДИДАТА

Докторска дисертација **Сузане Поповић** под називом "**Испитивање механизма дејства *Nakwonit-a* и *Korbazol-a***" представља оригиналан допринос потпунијем сагледавању нових терапеутских могућности коришћењем биолошки активних супстанци природног порекла. У раду су на најсавременији начин испитани механизми којима природни производи *Nakwonit* и *Korbazol* селективно индукују апоптозу у малигним лимфоцитима периферне крви оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије. Сам избор проблема којим се кандидат бави је изузетно значајан на пољу терапије канцера. Методологија за коју се кандидат одлучио дала му је могућност да дође до веома значајних података, да их опробаним статистичким поступцима провери и на основу свега тога донесе критичке закључке. У анализи добијених резултата кандидат је показао велику способност за коришћење релевантне биомедицинске литературе.

На основу свега изложеног Комисија са задовољством предлаже Већу Ментора да прихвати извештај о оцени завршене докторске дисертације под називом "Испитивање механизма дејства *Nakwonit-a* и *Korbazol-a***" кандидата Сузане Поповић и одреди комисију за јавну одбрану.**

У Крагујевцу
16.02..2009. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Небојша Арсенијевић, председник
Редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу

Доц. др Дејан Баскић, ментор
Доцент Медицинског факултета у Крагујевцу

др. сци. Љиљана Вучковић-Декић, члан
Научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије

Проф. Др Драган Миловановић, члан
Ванредни професор Медицинског факултета у Крагујевцу

Доц. др Михајло Јаковљевић, члан
Доцент Медицинског факултета у Крагујевцу
