

ОБРАЗАЦ 6

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПРИМЛ.	15. 04. 2025			
Орг. јед.	05	2538		Вредност

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

и

ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 19.2.2025. године (број одлуке: IV-03-68/26) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксибензил)) сирћетне киселине”, кандидата др Кемала Ћоровића, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за коју је именован ментор др Данијела Стојковић, научна сарадница и коментор др Бојан Стојановић, ванредни професор.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације:
„Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксибензил)) сирћетне киселине“
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикана, једначина и референци) (до 500 карактера):
Докторска дисертација кандидата Кемала Ћоровића представља оригиналну научну студију, у оквиру које су синтетисана четири диалкил естра (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксибензил)) сирћетне киселине, њихови одговарајући паладијум(II) комплекси и испитивана је њихова биолошка активност. Дисертација обухвата 90 страница и структурирана је у седам поглавља: Увод, Циљеви и хипотезе истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература. Рад садржи 13 фигура, 7 табела и 2 схеме, док поглавље Литература укључује 320 библиографских јединица, које обухватају како домаће, тако и иностране научне публикације.
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):
Ова докторска дисертација обухвата синтезу диалкил естара (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксибензил)) сирћетне киселине и њихових одговарајућих паладијум(II)

комплекса. Састав синтетисаних лиганада и комплекса утврђен је на основу резултата елементарне микроанализе; док су њихове структуре предвиђене на основу инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра. Након тога испитиване су антитуморска и антимикробна активност синтетисаних лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса; као и интеракције синтетисаних паладијум(II) комплекса са биолошки значајним молекулима.

1.4.Анализа испуњености полазних хипотеза:

У складу са постављеним хипотезама, најпре је синтетисана (S,S)-пропиледиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетна киселина, затим су из награђене киселине естерификацијом добијени диалкил естри (етил, пропил, бутил и пентил) са којима су синтетисани одговарајући паладијум(II) комплекси. Резултати елементарних микроанализа су у сагласности са претпостављеним саставом синтетисаних лиганада и комплекса. На основу спектроскопских података утврђено је да се O,O'-диалкил естри (S,S)-пропилендиамин -N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине координују за паладијум(II) јон бидентатно преко два азотова атома из пропилендиаминског ланца лиганда. Резултати тестова цитотоксичне активности су указали да пентил естар показује снажну цитотоксичност према туморским ћелијама, док његов одговарајући паладијум(II) комплекс испољава изражену селективност према неканцерогеним ћелијама. Поред тога, поменути лиганд и комплекс су индуковали апоптозу у ћелијама карцинома дебелог црева (HCT116), што је потврђено повећаном експресијом активне каспазе-3, смањењем експресије антиапоптотског протеина Bcl-2, као и инхибицијом ћелијске пролиферације кроз редукцију експресије Ki-67 и заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази. Резултати антимикробне активности показали су селективну и умерену активност синтетисаних једињења. Сви синтетисани комплекси показали су високи афинитет везивања за HSA протеин, са релативно високим константама везивања. Студије интеракције са CT-DNA откриле су да се паладијум(II) комплекси везују за DNA, при чему мерења вискозности указују на одсуство интеркалације између база DNA, што сугерише везивање за мање или веће жлебове молекула DNA.

1.5.Анализа примењених метода истраживања:

У овој дисертацији примењен је свеобухватан методолошки приступ који обухвата синтезу, спектроскопску карактеризацију и испитивање биолошке активности нових лиганда и њихових паладијум(II) комплекса. Реакције синтезе диалкилестара и одговарајућих паладијум(II) комплекса вршене су по већ раније познатом поступку. Састав синтетисаних лиганада и комплекса утврђен је на основу резултата елементарне микроанализе; док су њихове структуре предвиђене на бази инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра. Флуоресцентна спектроскопија је коришћена за процену интеракције са DNA и својстава везивања испитиваних комплекса за протеине, док су мерења вискозности допринела разумевању типа интеракције са DNA молекулом. Цитотоксична активност и лиганада и комплекса испитана је применом MTT теста на мишјим ћелијама карцинома дојке (4T1), хуманим ћелијама карцинома дојке (MDA-MB-468), мишјим ћелијама колоректалног карцинома (CT26), хуманим ћелијама колоректалног карцинома (HCT116) и здравим мишјим мезенхималним матичним ћелијама (mMSC), чиме је омогућена процена селективности и ефикасности једињења у односу на стандардни хемиотерапеутски агенс. Даља анализа апоптотског одговора, као и утицаја на ћелијски циклус, спроведена је применом проточное цитометрије, уз употребу специфичних флуорофора и антитела (Annexin V-FITC/PI, Bcl-2, каспаза-3, Ki-67, циклин D) чиме је добијен дубљи увид у механизме антипролиферативног дејства активних једињења. Антимикробна активност је процењена применом микродилуционе методе са ресазурином, при чему су одређене минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне микробицидне концентрације (MMC) за различите бактеријске и гљивичне сојева, укључујући референтне и клиничке изолате. Статистичка обрада података је спроведена коришћењем софтвера SPSS, применом одговарајућих параметарских и непараметарских

тестова, што је омогућило објективну интерпретацију резултата и потврду статистичке значајности добијених података. Све примењене методе су адекватно одабране, репрезентативне и валидиране, што доприноси поузданости и научној релевантности резултата дисертације.

1.6.Анализа испуњености циља истраживања:

У складу са дефинисаним експерименталним задацима, синтетисана је (S,S)-пропиледиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетна киселина, затим су из награђене киселине добијени диалкил естри (етил, пропил, бутил и пентил) са којима су потом синтетисани одговарајући паладијум(II) комплекси. Састав синтетисаних једињења предвиђен је применом резултата елементарне микроанализе, док су структуре добијених лиганата и одговарајућих паладијум(II) комплекса, као и начин координације предвиђене према броју, положају и изгледу сигнала у ¹H и ¹³C NMR спектрима.

Цитотоксични и антипролиферативни ефекти новосинтетисаних лиганата и комплекса испитани су *in vitro* на различитим ћелијским линијама, укључујући карценогене и здраве ћелије. На основу добијених резултата сва испитивана једињења су смањила виталност не-туморских ћелија на дозно-зависни начин, док је пентил естар показао значајну цитотоксичност према карциногеним ћелијама уз ниску токсичност према неканцерогеним ћелијама, што указује на његову потенцијалну селективност и ефикасност. Такође, поменути лиганд и његов одговарајући паладијум(II) комплекс, индуковали су апоптозу HCT116 ћелијама, што је потврђено повећаним бројем ћелија у раној и касној фази апоптозе, појачаном експресијом активне каспазе-3, и смањеном експресијом антиапоптотског протеина Bcl-2. Применом флуоресцентне спектроскопије праћене су структурне промене у HSA узроковане додавањем паладијум(II) комплекса и одређене су константе гашења (K_q), константе везивања (K) и број места везивања (n). Такође, флуоресцентном спектроскопијом одређен је начин везивања нових паладијум(II) комплекса за CT-DNA. Антимикробна активност испитиваних једињења је варијала у зависности од врсте микроорганизама и типа супстанце. Генерално, тестирана једињења показала су селективну и умерену активност, при чему је пентил естар показао најјаче антимикробно дејство према већини тестираних Грам-позитивних бактерија и гљивица.

1.7.Анализа добијених резултата истраживања и списак објављених научних радова кандидата из докторске дисертације (аутори, наслов рада, назив часописа, волумен, година објављивања, странице од-до, DOI број¹, категорија):

У оквиру резултата који се односе на хемијске карактеристике новосинтетисаних лиганата и комплекса, њихова структура је предвиђена спектроскопским методама (инфрацрвена и нукларно-магнетно-резонанционна спектроскопија). За испитивање интеракција са HSA, примењена је флуоресцентна спектроскопија. Додавањем паладијум(II) комплекса у раствор HSA, постепено је смањиван интензитет флуоресценције HSA са порастом концентрације комплекса. Ово смањење у интензитету флуоресценције указује на гашење унутрашње флуоресценције HSA, што је резултат интеракције између испитиваних комплекса и HSA. Високе константе везивања указују на јаку интеракцију између комплекса и HSA, што подразумева да HSA може послужити као транспортер ових комплекса до биолошких мета. Вредност n је приближно један за све комплексе, што указује на присуство само једног места везивања у HSA за сваки комплекс, чиме се још више потврђује специфичност везивања испитиваних паладијумових комплекса за HSA.

Такође је флуоресцентном спектроскопијом праћено смањење интензитета емисије система DNA-EB у зависности од концентрације додатих комплекса што је указало на то да комплекси конкуришу EB за везивање на DNA. Израчунате константе гашења, указују на то да сви

¹ Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

комплекси могу инетераговати са DNA, при чему мерења вискозности показују одсуство интеркалације између база DNA, што сугерише везивање за мање или веће жлебове молекула DNA. Даљи фокус истраживања био је усмерен испитивању биолошких активности (антитуморска и антимикробна активност) новосинтетисаних паладијум(II) комплекса. цитотоксичност новосинтетисаних лиганда, као и њихових одговарајућих паладијум(II) комплекса анализирана је применом МТТ теста на различитим ћелијским линијама, укључујући мишје ћелије карцинома дојке (4Т1), хумане ћелије карцинома дојке (MDA-MB-468), мишје ћелије колоректалног карцинома (СТ26), хумане ћелије колоректалног карцинома (HCT116) и здраве мишје мезенхималне матичне ћелије (mMSC). Резултати експеримента показали су да лиганди и комплекси испољавају умерене цитотоксичне ефекте који зависе од концентрације, са значајним смањењем вијабилности код обе врсте карцинома. Ови дозно-зависни ефекти указују на јасну корелацију између повећања концентрације једињења и смањења процента живих ћелија у свим тестираним ћелијским линијама карцинома. Конкретно, значајно смањење вијабилности забележено је на ћелијама карцинома дојке (мишјих 4Т1 и хуманих MDA-MB-468) и колоректалног карцинома. Резултати процене цитотоксичности извршене на mMSC ћелијама показали су да сви тестирани лиганди и комплекси смањују вијабилност mMSC ћелија на дозно-завистан начин где је уочен постепен пад вијабилности mMSC са повећањем концентрације једињења. Посебну пажњу привукао је паладијум(II) комплекс са пентил естром, који је показао релативно нижу цитотоксичност на mMSC у концентрацијама од 7,8 до 63,5 μM у односу на његове ефекте на ћелијске линије карцинома, како мишјег (4Т1 и СТ26) тако и хуманог порекла (MDA-MB-468 и HCT116). Ова разлика у цитотоксичном профилу указује на могућу селективну активност поменутог комплекса према туморским ћелијама, што га чини потенцијалним кандидатом за даља истраживања као селективно цитотоксично средство са мањим штетним ефектима на здраве ћелије. Ова запажања сугеришу да би комплекс С4 могао бити толерантнији у живим организмима у односу на друге комплексе из исте серије. С друге стране, сам лиганд – пентил естар је испољио минималну цитотоксичност на mMSC при нижим концентрацијама (7,8 до 31,25 μM). Ипак, са повећањем концентрације, дошло је до значајног смањења процента вијабилности mMSC, што указује да је при већим концентрацијама потребно бити опрезан због могућих штетних ефеката на здраве ћелије. На основу ових резултата, пентил естар и његов одговарајући паладијум(II) комплекс издвојени су као најперспективнији кандидати за даља испитивања на молекулском нивоу, која ће омогућити дубљу анализу њихових механизма дејства на ћелије карцинома, уз посебан акценат на њихову селективност и потенцијалну примену у терапији.

Резултати из докторске дисертације су публиковани у оригиналном научном раду:

Kemal Ćorović, Danijela Lj. Stojković, Đorđe S. Petrović, Sandra S. Jovičić Milić, Maja B. Đukić, Ivana D. Radojević, Ivana Raković, Milena Jurišević, Nevena Gajović, Marina Jovanović, Jovana Marinković, Ivan Jovanović, Bojan Stojanović. Newly synthesized palladium(II) complexes with dialkyl esters of (S,S) propylenediamine-N,N'-di- (2,2'-di-(4-hydroxy-benzil))acetic investigation acid: in vitro of biological activities and HSA/DNA binding. Dalton Trans 2024;53(18): 7922-7938. doi:10.1039/d4dt00659c. (M21)

1.8. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области и анализа извештаја о провери докторске дисертације на плагијаризам (до 1000 карактера):

Прегледом релевантне научне литературе, спроведеним претраживањем биомедицинских база података „Medline“ и „KoBSON“, уз употребу одговарајућих кључних речи : „palladium(II) complexes“, „dialkyl esters“, „cytotoxic activity“, „colorectal cancer“, „breast cancer“, „antimicrobial activity“, нису пронађене студије које би имале идентичан истраживачки дизајн и методологију. Извештај о провери докторске дисертације на плагијаризам показао је 12% подударана и то у највећем делу који није последица цитата, личних имена, библиографских

података о коришћеној литератури, односи се на ауторове претходно публиковане резултате у истраживањима која су имала примењену исту или сличну методологију, као и на резултате који су проистекли из истраживања спроведеног у оквиру ове дисертације. Поред тога, у оквиру дисертације у потпуности су испоштована академска правила при цитирању, навођењу извора и научне етичке норме, чиме је осигуран интегритет и аутентичност научног рада. На основу наведених налаза, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата Кемала Ћоровића, под називом „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксibenзил)) сирћетне киселине“, представља резултат оригиналног научног истраживања и докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за одбрану може наставити.

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

Колоректални карцином представља један од главних узрока смртности од малигних обољења на глобалном нивоу, што је подстакло интензивна истраживања у области медицинске и бионеорганске хемије с циљем развоја ефикаснијих терапијских приступа.

Стога су последњих деценија, истраживања других прелазних метала постала актуелна, пошто представљају обећавајућу основу за развој нових антитуморских агенаса. Паладијум и платина, припадају групи прелазних метала, а због својих физичких и хемијских сличности, сматра се да комплекси који садрже паладијум имају антитуморска својства слична комплексима платине. Комплекси паладијума(II) су недавно испитивани као потенцијални хемотерапеутици, због њихових структурних и термодинамичких сличности са комплексима платине(II). Истраживања су показала да неки паладијум(II) комплекси показују сличну, па чак и бољу антитуморску активност у поређењу са цисплатином и њеним аналогама. На жалост, потенцијална терапијска примена паладијум(II) комплекса значајно је отежана због њихове ниже стабилности у организму и веће реактивности према биомолекулима. Комплекси паладијума(II) представљају перспективну категорију терапијских агенаса, захваљујући својој изразитој антитуморској активности која се заснива на способности да инхибирају раст туморских ћелија и изазову апоптозу. Различити комплекси паладијума, укључујући тетрануклеарне, динуклеарне и мононуклеарне структуре, показали су изузетну цитотоксичност према различитим људским и животињским туморским ћелијским линијама.

У овој студији синтетисана су четири диалкил естра (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине, као и њихови одговарајући паладијум(II) комплекси при чему је извршена њихова структурна карактеризација и испитивање биолошких активности. Резултати тестова цитотоксичне активности су показали да пентил естар показује снажну цитотоксичност према туморским ћелијама, док његов одговарајући паладијум(II) комплекс испољава изражену селективност према неканцерогеним ћелијама. Поред тога, поменути лиганд и комплекс су индуковали апоптозу у ћелијама карцинома дебелог црева (HCT116), што је потврђено повећаном експресијом активне каспазе-3, смањењем експресије антиапоптозоног протеина Bcl-2, као и инхибицијом ћелијске пролиферације кроз редукцију експресије Ki-67 и заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази. Антимикробна испитивања показала су селективну и умерену активност синтетисаних једињења, при чему је интензитет дејства значајно варирао у зависности од врсте микроорганизма и типа једињења, што указује на специфичну селективност према одређеним патогенима. На основу ових резултата, пентил естар и његов одговарајући паладијум(II) комплекс издвојени су као најперспективнији кандидати за даља испитивања на молекулском нивоу, која ће омогућити дубљу анализу њихових механизма дејства на ћелије карцинома, уз посебан акценат на њихову селективност и потенцијалну примену у терапији.

1.10.Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):

На основу анализе достављене документације Комисија константује да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације кандидата Кемала Ћоровића под називом „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксибензил)) сирћетне киселине“ у складу са студијским програмом Докторских академских студија, општим актом Факултета и општим актом Универзитета.

2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксибензил)) сирћетне киселине“, кандидата Кемала Ћоровића, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:

Иван Јовановић, редовни професор
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Микробиологија и имунологија
Председник комисије

Ненад Марковић, доцент
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Хирургија
Члан комисије

Јовица Томовић, доцент
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Фармацеутска анализа
Члан комисије

Сандра Јовичић Милић, научна сарадница
Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу
Хемија
Члан комисије

Зоран Марковић, редовни професор
Државног Универзитета у Новом Пазару
Органска хемија
Члан комисије