

ОБРАЗАЦ 6

ПРИМЛАСЕ	29. 10. 2024
Оригинал	Број одлуке
05	11 346

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 10.7.2024. године (број одлуке: IV-03-558/30) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамoцелуларног карцинома усне дупље *in vitro*”, кандидата Мионе Глишић, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за коју је именован ментор Милан Зарић, ванредни професор.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације:
Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамoцелуларног карцинома усне дупље <i>in vitro</i>
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са знаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикона, једначина и референци) (до 500 карактера):
Ова докторска дисертације је написана на 90 страна и садржи 7 поглавља (Увод, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература). Резултати студије су приказани кроз 7 слика, 9 графикона и 2 табеле. Литературу чини 255 референци. Главни циљ истраживања био је испитивање антитуморског ефекта, као и механизма дејства новосинтетисаних динуклеарних комплекса паладијума: Pd1 ($[(Pd(dien))_2(\mu-pz)(ClO_4)_4]$) и Pd2 ($[(Pd(dien))_2(\mu-pydz)(ClO_4)_4]$) на ћелијске линије сквамoцелуларног карцинома језика.
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):
Предмет истраживања ове докторске дисертације било је дефинисање антипролиферативног ефекта новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине на ћелије сквамoцелуларног карцинома језика и фибробласти. Поред тога, детаљно су анализирани односи некрогичне и апоптотске смрти канцерских ћелија, као и утицаји на: одвијање ћелијског циклуса тестираних ћелија, релативни однос проапоптотичног протеина <i>bax</i> и антиапоптотичног <i>bcl2</i> протеина, активацију <i>bax</i> -а и каспазе-3.

1.4. Анализа испуњености полазних хипотеза:

Полазне хипотезе докторске дисертације биле су:

1. Комплекси Pd1 и Pd2 имају снажни антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије, а демонстрирају слабији антипролиферативни ефекат на здраве фибробласте
2. Тестирани комплекси заустављају ћелијски циклус канцерских ћелија и тиме смањују брзину њихове пролиферације
3. Тестирани комплекси антипролиферативни ефекат индукују покретањем апоптозе, при чему долази до повећања релативног однос $bax/bcl2$, и активира се каспаза-3

Све полазне хипотезе су јасно и прецизно дефинисане и проистичу из циљева истраживања. Резултати докторске дисертације су у потпуности потврдили све постављене хипотезе.

1.5. Анализа примењених метода истраживања:

Методологија истраживања је прецизно и јасно описана, у складу са постављеним циљевима и хипотезама студије. Истраживање је спроведено као експериментална студија *in vitro*, на ћелијским линијама хуманог порекла. У истраживању су коришћене две врсте ћелија: епителне ћелије изоловане из језика пацијента мушког бола са дијагнозом сквамозелуларног карцинома језика и малигно неизмењене ћелије хуманих фибробласта. Обе врсте ћелија су третиране новосинтетисаним комплексима паладијума: Pd1 - $([Pd(dien)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(dien)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$. Ова једињења су пре коришћења у овој студији окарактерисана елементарном микроанализом, инфрацрвеном и NMR спектралном анализом. За потребе истраживања коришћени су раствори ових комплекса у диметилсулфоксиду, стабилност ових раствора је потврђена снимање UV-VIS спектра.

За потребе процене стопе преживљавања ћелија, као и за метаболичку активност истих након третмана испитиваним комплексима коришћен је МТТ тест. Степен вијабилности ћелијских линија испитиван је у три временска интервала (након 24, 48 и 72 часа), при чему су коришћене различите концентрације испитиваних комплекса (распон концентрација 0,1 – 100 μM). Као референтни лек у овом истраживању коришћени су цисплатина и оксалиплатина. Након спроведеног МТТ теста и читавања вредности апсорбанце на ELISA читачу на основу добијених резултата прорачунаване су стопа преживљавања ћелија, као и цитотоксичност. За ове прорачуне коришћене су формуле које су раније описане у литератури. На основу добијених података даље су израчунате вредности половине максималне инхибиторне моларне концентрације (IC50 вредности).

Након што је потврђен антитуморски ефекат испитиваних комплекса следећи корак био је испитивање механизма који су укључени у те ефекте. За те потребе коришћен је Annexin V/PI тест, којим је одређиван релативни однос ћелија које се налазе у апоптози и некрози употребом проточне цитометрије. За потребе ових анализа коришћене су IC50 концентрације комплекса које су добијене на основу претходних резултата. 24 часа након третмана ћелија комплексима паладијума ћелије су припремљене за даљи ток анализе. За обраду и анализу добијених резултата коришћен је програм за проточну цитометрију FlowJo VX.

Следећи корак у истраживању био је анализа утицаја испитиваних комплекса на прогресију ћелијског циклуса хуманог сквамозелуларног карцинома *in vitro*. За потребе овог дела испитивања коришћено је бојење пропиридијум јодидом и проточна цитометрија. На овај начин поређено је како се нетретиране ћелије и ћелије третиране комплексима паладијума дистрибуирају у различитим фазама ћелијског циклуса. И у овом делу истраживања коришћене су IC50 концентрације комплекса, дужина експозиције ћелија била је 24 часа. Након тога ћелије су одговарајућим поступцима припремљене за анализу проточном цитометријом. Подаци су обрађени у коришћењем FlowJo VX програмског пакета.

С обзиром да је доказано да је доминантни механизам којим комплекси паладијума делују на ћелије сквамозелуларног карцинома апоптоза, следећи корак у истраживању био је испитивање

спољашњег и унутрашњег пута апоптозе. С тим у вези квантификована је активност и концентрације кључних протеина који су укључени у процес апоптозе. Анализирана су два протеина: *bax* као проапоптотични протеин и *bcl2* као антиапоптотични протеин. Осим анализе протеина спроведено је и испитивање активације каскаде каспаза, тј. мерење присуства активне каспазе-3. Као и за претходне анализе и овде је коришћена IC50 концентрација комплекса и време излагања од 24 часа.

1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

У овој докторској дисертацији дефинисани су следећи циљеви:

1. Дефинисање потенцијалног антипролиферативног дејства комплекса паладијума (*Pd1* - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и *Pd2* - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$) на следеће ћелијске линије (SCC-4 – сквамозелуларни карцином језика и MRC-5 – контролна линија, фибробласти).
2. Дефинисање односа некротичне и апоптотске смрти канцерских ћелија индуковане од стране тестираних комплекса.
3. Дефинисање утицаја испитиваних комплекса на одвијање ћелијског циклуса тестираних ћелија
4. Одређивање утицаја тестираних комплекса на релативни однос проапоптотичног протеина *bax* и антиапоптотичног *bcl-2* протеина.
5. Одређивање ефеката испитиваних супстанци на активацију *bax*-а и каспазе-3.

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):

Резултати ове докторске дисертације су показали да новосинтетисани комплекси паладијума Pd1 и Pd2 делују цитотоксично на ћелије сквамозелуларног карцинома језика, при чему имају слабо цитотоксично дејство на фибробласте, тј. контролну групу ћелија. При чему је доказано да је доминантни механизам дејства на канцерске ћелије покретање апоптозе.

Ови комплекси повећају проценат проапоптотског протеина *bax* и смањују проценат антиапоптотског протеина *bcl2* код ћелија сквамозелуларног карцинома језика (SCC-4).

Апоптоза која је индукована применом ових комплекса настаје као последица активности каскаде каспаза.

Испитивани комплекси заустављају ћелијски циклус туморских ћелија SCC-4 чиме се успорава њихова пролиферација и даља прогресија тумора. Заустављањем ћелијског циклуса ови комплекси могу и директно индуковати апоптозу.

Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$:

- делују цитотоксично на ћелије сквамозелуларног карцинома језика SCC-4;
- имају слабо цитотоксично дејство на испитиване, малигно неизмењене ћелије MRC-5 (фибробласти);
- смањују вијабилност туморских ћелија тако што доминантно индукују процес програмиране ћелијске смрти, односно индукцијом апоптозе ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4;
- заустављају ћелијски циклус ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4;
- утичу на релативни однос проапоптотичног протеина *bax* и антиапоптотичног *bcl-2* протеина код испитиваних ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4 тако што повећавају проценат активног проапоптотичног протеина *bax* и смањују количину антиапоптотичног протеина *bcl-2*;

¹ Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

- повећавају проценат ћелија које емитују флуоресценцу на активну каспазу-3.

Glišić M, Čanović PP, Zarić MM, Živković Zarić RS, Franich A, Rajković S, Živković M. The cytotoxicity of palladium (II) complexes containing 1, 2 or 1, 4 diazine bridging ligands on squamous cell carcinoma cells in vitro: Insights in the mechanisms of action. *Applied Organometallic Chemistry*. 2024:e7449. doi. 10.1002/aoc.7449 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):

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним претраживањем база података „Medline“ и „KoBSON“ коришћењем одговарајућих кључних речи: palladium(II) complexes, squamous cell carcinoma, oral cavity malignancies, apoptosis, cell cycle, cytotoxicity, нису пронађене студије истог дизајна и методолошког приступа. Извештај о провери на плагијаризам показао је минималан степен подудараности текста и то у највећој мери услед навођења библиографских података о коришћеној литератури. Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Мионе Глишић под називом „Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамозелуларног карцинома усне дупље in vitro“ представља резултат оригиналног научног рада.

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

Тумори су након кардиоваскуларних болести водећи узрок смрти и представљају велики здравствени проблем. Терапијски приступ у лечењу малигнитета је веома сложен и обухвата хирушка ексцизију, зрачење и хемиотерапију. Основ за потпуно излечење је заправо рано дијагностиковање и адекватана терапијска мера. Савремена терапија антиканцерским лековима је показала снажан антипролиферативни ефекат индукцијом застоја у различитим фазама ћелијског циклуса. Међутим, кључни недостатак хемиотерапеутика је неселективност, при чему лекови показују снажан антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије. Поред тога, услед дуготрајне примене ових лекова може се јавити резистенција, при чему малигна ћелија развија механизме „одбране“ од хемиотерапеутика. Јасно је да претходно поменути недостаци антитуморске терапије воде ка појави веома озбиљних нежељених ефеката.

Синтеза нових потенцијалних хемиотерапеутика тежи да превазиђе недостатке као што су неселективност и резистенција, што је заправо есенцијално у терапијском приступу малигнитета. Једињења паладијума имају велики број предности у односу на једињења платине, која су тренутно у рутинској употреби, јер имају десет пута мању токсичност у односу на комплексе платине, али имају и снажан афинитет за молекулу *DNK* чиме блокирају процес репликације. Осим тога, различитим механизмима комплекси паладијума могу да активирају унутрашњи или спољашњи пут апоптозе туморских ћелија чиме доводе до оштећења на митохондријама, ендоплазматском ретикулуму или до заустављања ћелије у некој од фази митозе. Сазнања добијена из ове студије могу потенцијално инспирисати даља истраживања на тему иновативних третмана на бази паладијума у третману сквамозелуларног карцинома усне дупље. Додатно, ови резултати представљају добру полазну основу за даља in vivo испитивања примењених комплекса на анималним моделима.

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 констатује да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације кандидата Мионе Глишић под називом „Испитивање

цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамоцелуларног карцинома усне дупље in vitro“ у складу са студијским програмом Докторских академских студија, општим актом Факултета медицинских наука и општим актом Универзитета у Крагујевцу.

2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамоцелуларног карцинома усне дупље in vitro“, кандидата Миона Глишић, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:

Исидора Милосављевић, доцент
Факултет медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу
Фармацеутска биотехнологија

Председник комисије

Петар Чановић, ванредни професор
Факултет медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу
Биохемија

Члан комисије

Тибор Сабо, редовни професор
Факултет за примењену екологију Универзитета
Метрополитан у Београду
Примењена хемија

Члан комисије