



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-296/18 од 11.05.2023. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Мионе Глишић за израду докторске дисертације под називом:

**„Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамозелуларног карцинома усне дупље *in vitro*“**

Чланови испитне комисије су:

1. **др Исидора Милосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија, председник;
2. **др Александра Стојановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан;
3. **др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Карциноми усне дупље су на шестом месту по учесталости свих типова малигнитета. Најчешћи тип малигнитета усне дупље су сквамозелуларни карциноми, малигни тумори који потичу од ћелија мукозе. Најчешћа локализација интраоралних сквамозелуларних карцинома је бочна ивица и вентрална површина језика. Узроци који доводе до појаве сквамозелуларног карцинома усне дупље су бројни, а међу њима спадају лоша хигијена усне дупље и траума. Огроман значај у лечењу ових промена имају рана дијагноза и адекватна терапија.

Највећи број пацијената који имају градус I - IVa карцинома усне дупље се подвргавају хируршкој терапији или хеморадијационој терапији. С друге стране, пацијенти који имају карциноме усне дупље градуса IVb или IVc бивају подвгнути само комбинацији зрачне и хемиотерапије, а зависно од општег статуса организма, често је хемиотерапија једини терапијски приступ. Стога је и у стоматологији, као и у другим гранама медицине немерљив значај савремених хемиотерапеутика.

Цисплатина (cis-диаминдихлоридоплатина(II)) се користи већ више од три деценије у хемиотерапији, самостално или у комбинацији са другим антитуморским агенсима. Недостатак примене цисплатине је њено токсично дејство, ограничена растворљивост и појава резистенције након дуже примене. У циљу проналажења комплекса мање токсичности, синтетисан је велики број комплекса платине(II) као што су карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, лобаплатина и хептаплатина. Поред тога, како би се лимитирајући ефекти цисплатине превазишли, новија истраживања се базирају на синтези различитих једињења паладијума која показују снажан цитотоксични ефекат, као и висок степен селективности *in vitro*.

## 2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Једињења паладијума имају низ других предности у односу на једињења платине. Конкретно, у токсиколошким студијама је показано да комплекси паладијума имају десет пута мању токсичност у односу на комплексе платине. Деривати паладијума имају снажан афинитет за молекул *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.

Претпоставка је да примена новосинтетисаних комплекса паладијума може значајно смањити вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе.

## 2.3. Наслов, циљеви и хипотезе докторске дисертације

**Наслов:** Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелије сквамозелуларног карцинома усне дупље *in vitro*

### Циљеви:

#### Главни циљ испитивања

1. Утврдити цитотоксичне ефекте различитих комплекса паладијума на ћелојске лчинеје сквамолелуларног карцинома језика.

#### Специфични циљеви испитивања:

1. Испитивање потенцијалне цитотоксичности комплекса паладијума:
  - Pd1 - ([Pd(diem)]<sub>2</sub>(μ-pz))(ClO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> и
  - Pd2 - ([Pd(diem)]<sub>2</sub>(μ-pydz))(ClO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>

на ћелијске линије:

- SCC-4 – сквамозелуларни карцином језика и
  - MRC-5 – здрави фибробласти (контрола).
2. Одредити релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама.
  3. Утврдити утицај испитиваних супстанци на релативни однос проапоптотичног протеина Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина.
  4. Одредити ефекат испитиваних супстанци на активацију Вах-а и каспазе-3.

#### **Хипотезе:**

1. Комплекси Pd1 и комплекс Pd2 делују цитотоксично на туморске ћелије, а не делују цитотоксично на здраве фибробласте.
2. Наведене супстанце индукују апоптозу туморских ћелија, повећавајући релативни однос Вах/Bcl-2, што доводи до активације каспазе-3.

## **2.4. Методе истраживања**

### **2.4.1. Врста студије**

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

### **2.4.2. Популација која се истражује**

За истраживање ће се користити ћелије SCC-4 – сквамозелуларни карцином језика и MRC-5 – здрави фибробласти (контрола) на којима ће бити испитивани комплекси паладијума.

### **2.4.3. Варијабле које се мере у студији**

Независне варијабле студије (узрок) представљаће примењени комплекси паладијума, а зависне варијабле (исход), представљаће измерене вредности параметара вијабилности и апоптозе туморских ћелија. Испитивања ће се вршити у лабораторијама Института факултета медицинских наука у Крагујевцу.

У свим узорцима који буду укључени у студију одређиваће се вијабилност ћелија 24, 48 и 72 часа након третмана различитим концентрацијама испитиваних комплекса (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 и 100 $\mu$ M) у односу на нетретирание ћелије применом МТТ теста. Цисплатина и оксалиплатина ће се користити као референтни цитостатици. релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване комплексима паладијума испитаће се методом проточне цитометрије ћелија бојених Annexin-ом V и пропидијум-јодидом. Проточном цитометријом и бојењем специфичним антителима за Вах, Bcl-2 и

активну каспазу-3 ћемо одредити релативни однос проапоптотичног Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина, односно проценат ћелија код којих је дошло до активације Вах-а и каспазе-3 у групи третираних у односу на нетретиране туморске ћелије.

#### **2.4.4. Снага студије и величине узорка**

Величина група је одређена на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 95%, вероватноће грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе. Укупна величина узорка (total sample size=54) израчуната је на основу програма *G power* и коришћењем теста корелације (Correlation: point biserial model). Вредност коефицијента детерминације ( $\rho^2$ ) је 0.2. После регрутације половине предвиђених испитаника биће учињена прелиминарна статистичка анализа на основу чијих резултата се укупни студијски узорак може смањити.

#### **2.4.5. Статистичка анализа**

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 20.0 for Windows*: За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.

### **2.5. Значај истраживања за развој науке**

Предложена студија ће омогућити боље разумевање потенцијалног цитотоксичног ефекта комплекса паладијума на ћелије сквамоцелуларног карцинома *in vitro*. Додатно, омогућиће се дефинисање механизма деловања комплекса паладијума кроз испитивање про- и антиапоптотских протеина.

### **2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје**

С обзиром да су карциноми усне дупље на шестом месту по учесталости свих типова малигнитета, а да је најчешћи тип сквамоцелуларни карцином који се са ограниченим успехом лечи применом металофармацеутика овим истраживањем би се испитао и потенцијални ефекат новосинтетисаних комплекса паладијума. Најзначајнији резултат био би потенцијално антитуморско дејство испитиваних новосинтетисаних комплекса паладијума. Таква супстанца би могла даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за лечење сквамоцелуларног карцинома усне дупље.

## 2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Миона Глишић је дипломирала на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу на Интегрисаним академским студијама стоматологије 2017. године. На истоименом факултету завршила је специјалистичке студије 2023. године из области Болести зуба и Ендодонција.

Као први аутор објавила је један рад у целини у часопису категорије M51, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

**Glišić M, Milojević-Šamanović A, Milinković M, Ranković M.** The effects of different drugs with anti-inflammatory potential in prevention of pulp damage during the teeth bleaching. *Ser J Exp Clin Res.* 2021; doi: 10.2478/sjecr-2021-0015. **M51**

## 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Милан Зарић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија. Проф. др Милан Зарић испуњава све услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

### 3.1. Компетентност ментора

проф. др Милан Зарић

1. **Zarić M, Popović S, Baskić D, Jovanović D, Djurdjević P, Živković Zarić R, Canović P, Zelen I.** Ligustrum vulgare leaves and fruit extract induce apoptosis of human leukemia cells. *Periodicum Biologorum* 2021;123(3–4):71–77.
2. Simić D, **Zarić M**, Nikolić I, Živković-Zarić R, Čanović P, Kočović A, Radojević I, Raković I, Milić SJ, Petrović Đ, Stojković D. Newly synthesized palladium (II) complexes with aminothiazole derivatives: in vitro study of antimicrobial activity and antitumor activity on the human prostate cancer cell line. *Dalton Trans.* 2022;51(3):1191-205.
3. **Zarić MM**, Čanović PP, Stanojević-Pirković M, Knežević SM, Živković-Zarić RS, Popovska-Jovičić B, Hamzagić N, Simović-Marković B, Marković N, Rilak-Simović A. New gold pincer-type complexes induce caspase-dependent apoptosis in human cancer cells in vitro. *Vojnosanit pregl.* 2020; doi: 10.2298/VSP190507002Z.
4. Marković N, **Zarić M**, Živković MD, Rajković S, Jovanović I, Arsenijević N, Čanović P, Ninković S. Novel platinum(II) complexes selectively induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells in vitro. *ChemistrySelect.* 2019;4:12971-12977.
5. Joksimović N, Janković N, Petronijević J, Baskić D, Popović S, Todorović D, **Zarić M**, Klisurić O, Vraneš M, Tot A, Bugarčić Z. Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with cisplatin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study. *Med Chem.* 2020;16(1):78-92.

**4. Научна област дисертације**

Медицина.

**5. Научна област чланова комисије**

1. **др Исидора Милосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија, председник;
2. **др Александра Стојановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан;
3. **др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан.

### Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада Мионе Глишић, комисија закључује да кандидат испуњава услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Тијане Јончић под називом: „Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса палладијума(II) на ћелије сквамозелуларног карцинома усне дупље *in vitro*“ и одобри њену израду.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **др Исидора Милосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија, председник

2. **др Александра Стојановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан

3. **др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан

У Крагујевцу, 22.05.2023. године