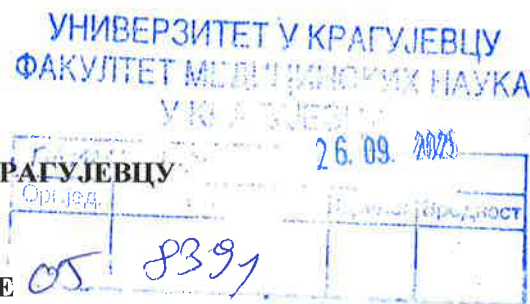


**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**  
**ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**  
**и**  
**ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ**  
**УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ**



На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 9.7.2025. године (број одлуке: III-01-1251/28) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама *in vitro*”, кандидата **Марије Булић**, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за коју је именован ментор **проф. др Марија Анђелковић**, ванредни професор.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

**ИЗВЕШТАЈ**  
**О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Подаци о докторској дисертацији</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1.1. Наслов докторске дисертације:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама <i>in vitro</i></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са знаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикона, једначина и референци) (до 500 карактера):                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Докторска дисертација кандидаткиње Марије Булић садржи сва неопходна поглавља: Увод, Циљеви, Хипотезе, Метод, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Написана је на укупно 110 страница и садржи 3 табеле, 20 слика и 25 графика. Приликом писања докторске дисертације кандидаткиња је цитирала укупно 388 библиографских извора који су адекватно наведени у поглављу Литература.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Предмет истраживања ове докторске дисертације односи се на антитуморску активност енона и њихових соли на малигне ћелије у <i>in vitro</i> условима. Лечење тумора је удружено са проблемом ограничене ефикасности тренутних терапијских протокола. Велики број истраживања усмерен је на синтезу једињења са антитуморским дејством, а значајан број њих потиче од хемијских деривата природних супстанци или њихових модификованих аналога. Истраживањем је испитан антитуморски ефекат осам новосинтетисаних супстанци - четири енона и њихових соли на хуманим ћелијским линијама карцинома дебелог црева и грлића материце, као и на здравим ћелијама. Такође је испитан ефекат ових супстанци на контролну групу здравих ћелија. |

Стога, главни циљ овог истраживања је *in vitro* испитивање антитуморског дејства новосинтетисаних енона и њихових соли и дефинисање селективности ових потенцијалних хемиотерапеутика.

#### 1.4.Анализа испуњености полазних хипотеза:

На почетку спровођења истраживања у оквиру докторске дисертације постављено је шест хипотеза које су адекватно тестиране:

1. Енони и соли енона показују цитотоксични ефекат на хумане туморске ћелије, уз минимално цитотоксично дејство на здраве ћелије.
2. Енони и соли енона испољавају јачи биолошки (антитуморски) ефекат у односу на цисплатину (референтну супстанцу).
3. Енони и соли енона индукују апоптозу хуманих туморских ћелија.
4. Енони и соли енона повећавају експресију Вах, смањују експресију протеина Bcl-2 у туморским ћелијама доводећи до премештања цитохрома c у цитосол ћелије и активације егзекуторске каспазе-3.
5. Енони и соли енона смањују митохондријални мембрански потенцијал у испитиваним туморским ћелијама.
6. Енони и соли енона индукују акумулацију туморских ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса.

#### 1.5.Анализа примењених метода истраживања:

Методе које су коришћене у дисертацији обухватају :

##### 1. МТТ тест за испитивање цитотоксичног деловања енона

Вијабилност испитиваних ћелија након третмана енонима и њиховим солима биће процењена помоћу МТТ теста. У метаболички активним ћелијама, МТТ се претвара у љубичасти формазан што представља индикатор вијабилности ћелија. Малигне и здраве ћелије ће бити третиране енонима и солима енона у различитим концентрацијама током 48 и 72 сата. После тога, сваком бунарићу ће се додати 100  $\mu$ l медијума са 20% МТТ раствора (5 mg/1ml у PBS-у). Након инкубације од 48 сати и 72 сата, оптичка густина (OD) се мери на 595 nm коришћењем уређаја Zenyth 3100 фирме Anthos Labtec Instruments.

Вијабилност ћелија ће се рачунати према формули: % вијабилних ћелија =  $(E-B)/(K-B) \times 100$  где је E - апсорбанца ћелија третираних енонима (E1-E4); B - апсорбанца контролне групе; K - апсорбанца нетретираних ћелија. На основу резултата МТТ теста биће израчунате IC50 концентрације за све испитиване супстанце и те концентрације ће бити коришћене у свим процедурама.

##### 2. Тип ћелијске смрти

Бојење Annexin-ом V и 7-aminoactinomycinom D (7-AAD) користиће се за одређивање типа ћелијске смрти испитиваних ћелија. Annexin V-FITC је индикатор ране фазе апоптозе, док се 7-AAD користи као индикатор некротичних ћелија или оних у касној апоптози. Анализа ће се обављати на проточном цитометру FACS Calibur, а подаци анализирати помоћу FlowJo софтвера.

##### 3. Анализа експресије и активације регулаторних протеина апоптозе

Промене у експресији регулаторних протеина (Вах, Bcl-2 и каспазе-3), на туморским и здравим ћелијама након третмана са IC50 концентрацијама испитиваних супстанци биће процењене проточном цитометријом помоћу апарата FACS Calibur. Резултати ће бити обрађени софтвером FlowJo.

##### 4. Анализа ћелијског циклуса

За испитивање ефеката енона на ћелијски циклус, туморске ћелије ће бити третиране IC50 концентрацијама током 48 сати. Након третирања, ћелије се фиксирају и

пермеабилитету у хладном 70% етанолу преко ноћи на температури +4°C, ресуспендују и инкубирају у 100 µl PBS са RNA-зом A (12091021, Sigma Aldrich) 30 минута на 37 °C. Центрифугирају се и у талог се додаје 500 µl раствора PI (B7758, Biotrend) уз инкубацију до 30 минута у мраку. Након овога следи анализирање ћелијског циклуса користећи flow цитометар Cytomics FC500, а добијени подаци се анализирају помоћу Flowing Software-a, а дистрибуција ћелија у ћелијском циклусу биће представљена хистограмима.

#### 5. Локализација и активација цитохрома c

У циљу потврде механизма апоптозе методом флуоресцентне микроскопије утврђиваће се експресија и локализација цитохрома c после 48h третмана IC50 концентрацијама енона и соли енона.

#### 6. Одређивање промене митохондријалног мембранског потенцијала

У здравим ћелијама JC-10 боја је локализована у митохондријалном матриксу у виду агрегата (црвена флуоросценција), док код апоптотичних ћелија она постаје мономерна и зелена. Управо зато нарушавање интегритета митохондријалног мембранског потенцијала које је праћено транслокацијом JC-10 боје служи као један од маркера за рану апоптозу након третмана испитиваним супстанцама. За одређивање митохондријалног мембранског потенцијала користиће се JC-10 боја (EnzoLifeSciences, Farmingdale, NY, USA) и инвертни флуоросцентни микроскоп FLUO500T (Grimm Libero). Добијене слике се анализираће се помоћу ImageJ софтвера.

#### 7. Статистичка обрада података

За статистичку анализу података биће коришћен комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 20). Подаци ће бити представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (SE) за три поновљена појединачна експеримента где ће подаци који прате нормалну расподелу бити анализирани помоћу Student-овог t-теста, док ће подаци који не прате нормалну расподелу бити анализирани помоћу Kruskal-Wallis-овог теста. Статистички значајним резултатима сматраће се они чија је p вредност мања или једнака вредности 0,05 док ће веома значајна разлика бити констатована при  $p < 0.01$ .

### 1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

Дефинисани циљеви ове докторске дисертације били су

1. Испитати потенцијални цитотоксични ефекат и механизам деловања енона и њихових соли на ћелије карцинома дебелог црева и грлића материце.
2. Испитати који од испитиваних молекула нема значајан цитотоксични ефекат према здравим ћелијама - контролним ћелијама фибробласта.
3. Упоредити цитотоксични ефекат енона и њихових соли у односу на референтну супстанцу (цисплатина).
4. Утврдити доминантан тип ћелијске смрти.
5. Утврдити ефекат енона и њихових соли на експресију, локализацију као и активацију протеина Вах, Bcl-2 и активне каспазе-3.
6. Испитати ефекат енона и њихових соли на митохондријални мембрански потенцијал ( $\Delta\psi_m$ ), експресију и локализацију цитохрома c.
7. Утврдити ефекат енона и њихових соли на ћелијски циклус малигних ћелија.

Анализом достављене докторске дисертације, може се констатовати да су наведени циљеви истраживања у потпуности испуњени. Одговоре на први циљ добили смо коришћењем МТТ теста где је јасно и детаљно испитан и доказан снажан антитуморски ефекат. Такође, одговоре на други циљ смо добили применом МТТ теста где је заправо показан висок степен селективности биолошки активних супстанци. Даље, испитиван је и антитуморски ефекат цисплатине, при чему су тестиране супстанце показале снажнији антитуморски ефекат, чиме смо добили одговор на трећи постављени циљ. Доминантан тип ћелијске смрти је одређиван методом ANEXIN V где је јасно показано да тестиране супстанце свој антитуморски ефекат остварују индукцијом апоптозе, чиме је јасно испуњен четврти циљ. Преостали циљеви су испитивани методама проточне цитометрије, флуоресцентне микроскопије и детекцијом ћелијског циклуса.

Истраживање је показало да тестиране супстанце смањују вијабилност канцерских ћелија индукцијом унутрашњег апоптотског пута и заустављањем ћелијског циклуса.

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 број<sup>1</sup>, категорија):

Најважнији резултати ове докторске дисертације огледају се у следећим сазнањима:

1. Новосинтетисани енони и њихове соли испољавају значајан цитотоксични ефекат на испитиваним туморским ћелијама.
2. Цитотоксични ефекат новосинтетисаних супстанци на здравим ћелијама у односу на туморске је занемарљив. Овим је потврђена туморска селективност новосинтетисаних молекула.
3. Резултати су такође показали да новосинтетисани молекули индукују јачу апоптозу у туморским ћелијама колоне у односу на туморске ћелије цервикса.
4. Дејство новосинтетисаних молекула на туморским ћелијама довело је до смањења митохондријалног мембранског потенцијала, нисходне експресије Bcl-2, усходне регулације Вах, активације каспазе 3 и ослобађања цитохрома c у цитоплазму ћелија.
5. Показано да новосинтетисани молекули индукују смрт туморских ћелија која је индукована активацијом унутрашњег, митохондријалног пута.

Резултати ове докторске дисертације објављени су у оригиналном научном раду:

1. Bulic M, Nikolic I, Mitrovic M, Muskinja J, Todorovic T, Andelkovic M. Four newly synthesized enones induce mitochondrial-mediated apoptosis and G2/M cell cycle arrest in colorectal and cervical cancer cells. RSC Adv; 2024,14, 33987-34005. doi: 10.1039/d4ra06529h

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 и систематским претраживањем биомедицинских база података “Medline”, “Web of Science” и “Scopus” уз коришћење кључних речи као што су enones, enone salts, cancer, cytotoxicity, apoptosis, cell cycle није пронађена ниједна студија истог дизајна и методологије, која је на свеобухватан и целовит начин проучавала антитуморски ефекат.

Извештај о провери оригиналности докторске дисертације указао је на минималан степен преклапања који је био последица цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторантских истраживања, који су проистекли из њене докторске дисертације.

<sup>1</sup> Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Узимајући ове чињенице у обзир, Комисија констатује да докторска дисертација под називом “Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама <i>in vitro</i>” представља резултат оригиналног научног рада кандидаткиње и ауторке Марије Булић.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>1.9.Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области:</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p>Лечење тумора често није задовољавајуће с обзиром да актуелни терапијски протоколи некада не обезбеђују задовољавајућу ефикасност. За то постоји више разлога - хетерогеност ћелија тумора представља значајан проблем, јер различите ћелије унутар истог тумора показују варијације у осетљивости на лекове што доводи до парцијалног одговора на терапију и такође повећава ризик од рецидива.</p> <p>Још један од разлога незадовољавајуће ефикасности терапије је развој резистенције на лекове која је честа и компромитује дугорочну ефикасност терапије. Појава резистенције након дуготрајне терапије може условити појаву метастаза.</p> <p>Посебан проблем када говоримо о савременој антитуморској терапији је неселективност. Прецизније, лекови показују цитотоксични ефекат и на малигно неизмењене ћелије, чиме је условљена појава великог броја нежељених нежељених ефеката. Нежељени ефекти који се јављају након дуготрајне антитуморске терапије обухватају нефротоксичност, кардиотоксичност, мучнину, повраћање итд.</p> <p>Стога, тестирање антитуморских ефеката енона и њихових соли на малигним ћелијама је од есенцијалног значаја у откривању потенцијалних хемиотерапеутика.</p> <p>Истраживање је показало велики број резултата који говоре у прилог даљег испитивања енона у примени лечења карцинома.</p> <p>У овом истраживању јасно је показано да соли енона испољавају снажан антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома дебелог црева и грлића материце у <i>in vitro</i> условима. Антитуморски ефекат је ових једињења је био снажнији у односу на референтни лек цисплатину. Осим тога, показана је и селективност, где је слаб цитотоксични ефекат показан на фибробласте.</p> <p>Сам механизам антипролиферативног ефекта се заснива на индукцији апоптозе и заустављању ћелијског циклуса.</p> <p>Стога се може констатовати да ова докторска дисертација пружа јединствено и свеобухватно испитивање биолошке активности енона и њихових соли.</p> |
| <p>1.10.Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>На основу анализе достављене документације, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације под називом “Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама <i>in vitro</i>” кандидата Марије Булић, а који су прописани студијским програмом, општим актима Факултета медицинских наука и општим актима Универзитета у Крагујевцу.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <p><b>2. ЗАКЉУЧАК</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <p>На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама <i>in vitro</i>”, кандидата <b>Марије Булић</b>, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

**Чланови комисије:**

Петар Чановић, ванредни професор  
Факултет медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу

Медицинске науке/Медицинска биохемија

**Председник комисије**

Ивана Николић, ванредни професор

Факултет медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу

Медицинске науке/Медицинска биохемија

**Члан комисије**

Бранка Ђорђевић, доцент

Медицински факултет Универзитета у Нишу

Медицинске науке/Биохемија

**Члан комисије**