

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

| I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ | | |
|--|------------------|---|
| 1. Датум и орган који је именовео комисију: 07.10.2022. Наставно-научно веће Медицинског факултета Универзитета Нови Сад | | |
| 2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> : | | |
| 1. Проф. др Барак Ото | Редовни професор | Физиологија, 14.04.2021. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Катедра за Физиологију Медицинског факултета у Новом Саду | | Председник комисије |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| 2. Проф. др Јасна Мариновић | Редовни професор | Физиологија, 01.02.2018. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Завод за интегративну физиологију, Медицински факултет, Свучилиште у Сплиту | | Члан комисије |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| 3. Доц. др Кладар Небојша | Доцент | Фармакогнозија са фитотерапијом, 15.09.2020. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Катедра за фармацију Медицинског факултета у Новом Саду | | Члан комисије |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ | | |
| 1. Име, име једног родитеља, презиме: Александра, Будимир, Поповић | | |
| 2. Датум рођења, општина, држава: 17.05.1989. Савски венац, Београд, Србија | | |
| 3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив: Медицински Факултет Универзитета у Новом Саду, Интегрисане академске | | |

студије медицине, доктор медицине

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:
2016. Докторске академске студије - Клиничка истраживања.

III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Антитуморски потенцијал и утицај на митохондријску респирацију Л-карнозина и његових формулација примењених на континуираним ћелијским линијама

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, схема, графикона и сл.

Кратак садржај:

1. Увод

Поглавље увод је написано на 44 стране, укључујући укупно 15 слика и 2 табеле.

2. Циљеви и хипотезе

Поглавље циљеви и хипотезе су представљене на две стране текста, где су приказани циљеви постављени у односу на податке приказане у уводном поглављу, а из наведених циљева проистичу основне хипотезе истраживања.

3. Методе, узорци и место експерименталног истраживања

У овом поглављу су детаљно описани материјали, методе, начин одабира узорка и место експерименталног истраживања на укупно 14 страница дисертације и укључују 2 табеле.

4. Резултати

Поглавље резултати обухвата 125 страна докторске дисертације, у оквиру којих су резултати истраживања приказани у виду 37 слика и укупно 48 графикона.

5. Дискусија

Поглавље дискусија је написано на 20 страна, у којем је детаљно извршена анализа добијених резултата и поређење са публикованим студијама.

6. Закључци

Закључци изведени из добијених резултата дисертације су приказани на 4 стране текста, са укупно 5 закључака.

7. Списак скраћеница

Објашњење свих скраћеница коришћених у рукопису дисертације наведено је на месту првог спомињања у тексту докторске дисертације и обухвата пуно име скраћеница.

8. Литература

Референце (укупно 406 навода) коришћене у изради дисертације су наведене према Ванкуверским правилима и изложене на 29 страна дисертације.

Целокупна дисертација садржи укупно 7 поглавља; 250 страница; 4 табеле; 52 слике и 48 графикона.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације „Антитуморски потенцијал и утицај на митохондријску респирацију Л-карнозина и његових формулација примењених на континуираним ћелијским линијама“ **је јасно и прецизно формулисано, у складу са главним садржајем истраживања.**

У поглављу **Увод** описане су одлике малигнух тумора и карактеристике енергетског метаболизма здравих и туморских ћелија. Акцент је стављен на туморској хетерогености у погледу метаболизма и начина добијања енергије као и о значајности спровођења истраживања на нивоу митохондрија као основних ћелијских органела у продукцији енергије и одржавању живота ћелија. Размотрена су и тренутна сазнања о значају одржавања очуваности интегритета као и функционисање комплекса респираторног ланца ових органела у процесу енергетског снабдевања самих ћелија. Детаљно су приказана и тренутна сазнања о епидемиолошким подацима, етиологији, дијагностици, класификацији и терапији хуманог карцинома дојке и хуманог глиобластома. Објашњене су и бројне улоге које супстанца Л-карнозин обавља у организму човека као и антитуморски потенцијал који испољава а доказан је многим савременим научним радовима.

Комисија сматра да увод пружа свеобухватан и савремен преглед проблематике којом се истраживање бави. Указано је на уочени проблем и на детаље који још нису разјашњени. Дефинисано је подручје истраживања и прецизно су објашњене потребе за истраживањем.

У односу на податке који су изнесени у уводном поглављу дисертације, постављени су јасни **Циљеви** из којих произилазе **хипотезе** истраживања. Основни циљеви дисертације обухватају следеће:

1. Испитати утицај различитих концентрација чисте супстанце Л-карнозин, препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] L-karnozin на морфолошке карактеристике континуираних ћелијских линија - БХК-21/Ц-13, МРЦ-5, МЦФ-7 и У87;
2. Испитати употребом МТТ методе утицај различитих концентрација чисте супстанце Л-карнозин, препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] L-karnozin на пролиферативну активност континуираних ћелијских линија - БХК-21/Ц-13, МРЦ-5, МЦФ-7 и У87;
3. Испитати употребом “*scratch eseja*” утицај различитих концентрација чисте супстанце Л-карнозин, препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] L-karnozin на прогрес миграције ћелија континуираних туморских ћелијских линија - МЦФ-7 и У87;
4. Испитати карактеристике имунофлуоресцентне позитивности структурног (виментин) маркера након третмана континуираних ћелијских линија - БХК-21/Ц-13, МРЦ-5, МЦФ-7 и У87 различитим концентрацијама чисте супстанце Л-карнозина, препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] L-karnozin;
5. Испитати утицај различитих концентрација чисте супстанце Л-карнозин, препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] L-karnozin на имунофлуоресцентну позитивност оксидативног (СОД2) маркера континуираних ћелијских линија - БХК-21/Ц-13, МРЦ-5, МЦФ-7 и У87.
6. Испитати утицај различитих концентрација чисте супстанце Л-карнозин, препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] L-karnozin на митохондријску респирацију

„интактних ћелија” (ћелија са ћелијском мембраном) и активност комплекса респираторног ланца митохондрија, континуираних ћелијских линија - БХК-21/Ц-13, МРЦ-5, МЦФ-7 и У87.

Хипотезе су јасно формулисане у односу на постављене циљеве истраживања, логичне и засноване на добро аргументованим основама. Комисија сматра да су циљеви истраживања јасно и прецизно дефинисани, а хипотезе постављене адекватно у односу на циљеве истраживања, те у потпуности усклађени са формулацијама наведеним у пријави теме докторске дисертације.

У поглављу **Материјал и методе**, јасно су дефинисани место експерименталног истраживања, начин узгајања и припреме континуираних ћелијских линија које су биле у употреби током огледа као и експериментални дизајн спроведеног истраживања. У поглављу материјал објашњен је и начин припреме испитиваних препарата непосредно пре спровођења самих третмана, док је у поглављу методе како би се обезбедила поновљивост студије описан поступак извођења свих лабораторијских техника и тестова коришћених у експериментима. Детаљно су описане методе помоћу којих су испитиване морфолошке карактеристике нативних и третираних ћелија, извођење стандардног хистолошког бојења, употреба МТТ теста у сврху утврђивања цитотоксичних ефеката испитиваних препарата на туморским и здравим ћелијским линијама, извођење имунофлуоресцентних бојења на анти-виментин и анти-СОД2 антитело као и техника мерења митохондријске респирације континуираних ћелијских линија која говори о биоенергетском потенцијалу и утицају на исти након спроведених третмана. За све изведене анализе у поглављу материјал наведене су све коришћене активне супстанце и њихове концентрације и инкубациони период при третману ћелија. На крају поглавља су наведене статистичке методе и софтвери коришћени за обраду добијених података.

Комисија сматра да су примењене методе истраживања описане јасно и детаљно чиме се у потпуности омогућава поновљивост експерименталних резултата. Изабране методе статистичке обраде података су адекватне и примерене истраживачком задатку. Комисија сматра да је избор коришћених метода испитивања адекватан што обезбеђује добијање у потпуности поузданих резултата у складу са постављеним циљевима дисертације.

Поглавље **Резултати** описује најважније резултате проистекле у оквиру сваког појединачног циља истраживања. Резултати испитивања су уверљиво, прегледно и концизно приказани табеларно и у виду графикона. Сви прикази праћени су јасним пратећим текстуалним тумачењима. Резултати произлазе из примењених метода уз коришћење адекватних статистичких метода. Добијени резултати у оквиру ове дисертације дају оригиналан допринос на тему антитуморског потенцијала чисте супстанце Л-карнозин као и карнозина из препарата Karnozin EXTRA® и Now® L-karnozin у *in vitro* условима на континуираним туморским линијама хуманог аденокарцинома дојке и хуманог глиобластома који се испољава кроз више нивоа деловања. Измена морфолошких својстава у погледу

облика и величине ћелија, инхибиција миграције ћелија које поседују ову способност, утицај на експримираност протеина виментина и СОД2 маркера, као и деловање на енергетски метаболизам ћелија у смислу редукције производње енергије у крајњем доводе до испољавања цитотоксичних ефеката ових препарата на МЦФ-7 и У87 ћелијским линијама. Како би се сагледали могући утицаји ових препарата на организам човека читав концепт студије спроведен је и на здравој ћелијској линији бубрега хрчка као и на ћелијама хуманих феталних фибробласта плућа.

Комисија сматра да су резултати приказани на систематичан и прегледан начин, логичним редоследом и да су свеобухватни и јасно интерпретирани.

У поглављу **Дискусија**, дато је појашњење добијених резултата испитивања као и поређење са савременим, актуелним и релевантним резултатима других истраживања. Дискусија је написана јасно, кандидаткиња аргументовано и критички анализира резултате истраживања упоређујући их са релевантним наводима из литературе. Дискусија добијених резултата је исцрпна, научно утемељена, те указује на изврсно познавање проучаване проблематике уз критички осврт у односу на актуелну литературу.

Комисија сматра да је дискусија добијених резултата свеобухватна, критички постављена и уверљива. Прецизно су истакнуте сличности и разлике између резултата добијених у дисертацији и актуелних података из литературе.

У поглављу **Закључак**, на основу добијених резултата и дискусије изведени су јасни и концизни, научно засновани и поуздани закључци. Комисија сматра да закључци произлазе из постављених циљева, примењених метода и резултата истраживања.

У поглављу **Литература** су наведени савремени извори информација, који су коришћени за припрему истраживања и дискусију резултата, а који су цитирани у тексту докторске дисертације по Ванкуверским правилима.

Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у складу са Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду који је повезан са садржајем докторске дисертације. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду уредника часописа о томе.

Радови објављени у научним часописима међународног значаја:

1. **Popovic A**, Drljaca J, Popovic M, Miljkovic D, Marinovic J, Ljubkovic M, et al. Mitochondrial Energy Metabolism in Baby Hamster Kidney (ВНК-21/С13) Cells

Treated with Karnozin EXTRA[®]. Int J Morphol. 2022;40(1). (M23, IF 0.519)

Радови у часописима националног значаја:

1. Garipi E, Rakovac (**Popović**) A, Barak O, Lukač D, Naumović N, Drapšin M et al. In situ analysis of mitochondrial respiratory capacity - foundation for cellular physiology. Medicinski pregljed. 2017; 70(11-12):445-8. (M51)

2. Miljković D, Drljača J, **Popović** A, Veljkov K, Bulajić D, Popović M. Ki-67 proliferation index and expression of vimentin in Bhk21/c13, Mcf-7 and Mrc-5 continuous cell lines. Medical data. 2019;11(2):075-080. (M52)

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу:

1. Drljača J, Popović A, Popović M, Miljković D, Vujkov M, Bulajić D, Ljubković M, Čapo I. Karnozin EXTRA[®] alters mitochondrial respiration via inhibition the activity of complex II. Serbian Biochemical Society X Conference, Beograd, 14-16 Novembar, 2019, pp.88-89. (M34)

2. Drljača J, **Popović** A, Popović M, Miljković D, Vujkov M, Bulajić D, Ljubković M, Čapo I. Karnozin EXTRA[®] alters mitochondrial respiration through its activity on oxidative phosphorylation. Pharmaceutica 2020, 21st International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery System; Rome, Italy- March 11-12, 2020. (M34)

3. **Popović** A, Drljača J, Popović M, Miljković D, Bulajić D, Marinović J, Ljubković M, Kladar N, Čapo I. The effects of Karnozin EXTRA[®] on mitochondrial bioenergetics in healthy fibroblasts. Serbian Biochemical Society X Conference, Kragujevac, 24 Septembar, 2021, pp.134. (M34)

4. **Popović** A, Drljača J, Popović M, Miljković D, Bulajić D, Kladar N, Čapo I, Marinović J, Ljubković M.

An in situ study of bioenergetic propertis of BHK21/C13 cells treated with Karnozin EXTRA[®] and NOW L-Carnosine[®]. 45th FEBS Congress, 3-8 July 2021, Slovenia. (M34)

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

У складу са постављеним циљевима, а на основу добијених резултата спроведеног истраживања у *in vitro* условима могу се извести следећи закључци:

1. Анализом морфолошких карактеристика и степена пролиферације:

а) - здравих ћелија бубрега хрчка (БХК-21/Ц-13) и хуманих феталних фибробласта плућа (МРЦ-5) након третмана чистом супстанцом Л-карнозина и карнозином из препарата Now[®] L-karnozin у свим испитиваним концентрацијама нису забележене промене. Исти ефекти примећени су и након третмана препаратом Karnozin EXTRA[®] у концентрацијама од 2 и 5 mM карнозина на БХК-21/Ц-13 ћелијама.

- евидентирано је да су третмани здравих БХК-21/Ц-13 ћелија концентрацијом од 10 mM карнозина из препарата Karnozin EXTRA[®] као и МРЦ-5 ћелија у свим испитиваним концентрацијама карнозина из овог препарата условили настанак морфолошких варијација као и смањење броја вијабилних ћелија.

б) - ћелија хуманог аденокарцинома дојке (МЦФ-7) и хуманог глиобластома (У87) примећено је да су спроведени третмани условили евидентан губитак карактеристичног облика и промене у димензијама као и присуство плутајућих ћелија у медијуму за раст, уз изражен цитотоксични ефекат.

2. Анализом миграторне способности туморских ћелија:

а) установљена је слаба миграторна способност контролне групе ћелија континуиране ћелијске линије хуманог аденокарцинома дојке (МЦФ-7).

б) забележен је дозно-зависни инхибиторни утицај на миграцију ћелија континуиране ћелијске линије хуманог глиобластома (У87) услед спроведених третмана.

3. Анализом ефеката испитиваних препарата на експресију виментина:

а) - утврђено је да примена чисте супстанце Л-карнозина као и карнозина из препарата Now[®] L-karnozin, у свим испитиваним концентрацијама, код ћелија обе здраве ћелијске линије доводи до смањења експресије виментина уз настанак евидентних промена у распореду самих влакана интермедијерних филамената као и губитак карактеристичних својстава виментинске мреже.

- евидентирано је да примена препарата Karnozin EXTRA[®] у све три испитивне концентрације карнозина у цитоплазми ћелија обе здраве ћелијске линије условљава пораст интензитета имунофлуоресцентног сигнала за испитивани протеин.

б) - установљено је да примена концентрација од 5 и 10 mM карнозина из препарата Karnozin EXTRA[®] на ћелијама хуманог глиобластома (У87) доводи до пораста вредности укупног интензитета флуоресцентног сигнала на протеин виментин.

- у цитоплазми ћелија хуманог глиобластома (У87) након третмана чистом супстанцом Л-карнозин и препаратом Now[®] L-karnozin у свим испитиваним концентрацијама као и препаратом Karnozin EXTRA[®] при концентрацији од 2 mM карнозина нису уочене значајне различитости у степену експресије виментина.

4. Анализом ефеката испитиваних препарата на ниво експресије оксидативног (СОД2) маркера:

а) - локализованог у митохондријама ћелија, примећено је да су третмани препаратом Karnozin EXTRA[®] при концентрацијама од 5 и 10 mM карнозина на обе

здраве ћелијске линије довели до значајног пораста вредности укупног интензитета флуоресценције. Исти ефекат евидентиран је и услед третмана чистом супстанцом Л-карнозин у концентрацији од 10 мМ, док ниже концентрације (2 и 5 мМ) нису условиле значајне промене.

- примећено је да услед третмана концентрацијама од 5 и 10 мМ карнозина из препарата Now® L-karnozin у митохондријама ћелија бубрега хрчка (БХК-21/Ц-13) долази до значајног смањења експримираности, док се код ћелија хуманих феталних фибробласта плућа (МРЦ-5) бележи пораст експресије испитиваног маркера.

б) - евидентирано је да спроведени третмани на ћелијама хуманог аденокарцинома дојке (МЦФ-7) доводе до значајног смањења нивоа експримираности.

- у митохондријама ћелија хуманог глиобластома (У87) спроведени третмани не узрокују значајније промене у односу на контролну групу.

5. Анализом ефеката испитиваних препарата на енергетски метаболизам:

а) - здравих ћелија бубрега хрчка (БХК-21/Ц-13) примећено је да су спроведени третмани условили повећање продукције енергије путем стимулације активности комплекса респираторног ланца митохондрија као и максималног капацитета електрон транспортног система. Међутим, примена испитиваних препарата у концентрацији од 10 мМ карнозина испољава инхибиторно дејство на свим нивоима респираторног ланца митохондрија уз последично смањење производње енергије.

- здравих ћелија хуманих феталних фибробласта плућа (МРЦ-5) спроведени третмани чистом супстанцом Л-карнозин као и препаратом Now® L-karnozin при свим испитиваним концентрацијама условили су инхибицију активности комплекса И респираторног ланца митохондрија уз последично смањење вредности максималног капацитета електрон транспортног система. Примена препарата Karnozin EXTRA® при свим испитиваним концентрацијама на овој ћелијској линији узроковала је инхибицију продукције енергије делујући на свим нивоима респираторног ланца митохондрија.

б) - установљено је да су спроведени третмани довели до инхибиције продукције енергије у ћелијама хуманог аденокарцинома дојке (МЦФ-7) делујући на свим нивоима респираторног ланца митохондрија. Исти ефекти забележени су и при третманима ћелија хуманог глиобластома (У87) препаратом Karnozin EXTRA® у свим испитиваним концентрацијама.

Комисија сматра да су формулисани закључци логично изведени из добијених резултата и јасно одражавају значај и научни допринос спроведеног истраживања.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:

Мишљење Комисије је да су резултати истраживања у оквиру докторске дисертације систематично, јасно и прикладно приказани и интерпретирани. Тумачење резултата се заснива на савременим и доступним научним сазнањима, те се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Дисертација садржи све битне елементе, укључујући сва потребна поглавља и свеобухватне оригиналне резултате истраживања. Дисертација је написана концизно, разумљиво и резултат је самосталних истраживачких напора кандидаткиње.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Дисертација је резултат оригиналног научног рада кандидаткиње. Представља експерименталну студију спроведену у сврху утврђивања утицаја чисте супстанце Л-карнозин као и препарата Karnozin EXTRA® и Now® L-karnozin на морфолошке карактеристике, пролиферативну активност и миграторну способност туморских ћелија као и утицај на степен експримираности интермедијерног филамента виментина у цитоплазми ћелија као и СОД2 маркера у митохондријама. Посебан акценат је стављен на мерења која се односе на митохондријску респирацију односно активност појединачних комплекса респираторног ланца ових органела што говори у прилог биоенергетског профила третираних ћелија. Актуелност теме потврђују бројне студије на тему антитуморског потенцијала испитиване супстанце. Резултати изнети у овој *in vitro* студији пружају драгоцене податке о хистолошким, физиолошким и биохемијским променама забележеним на испитиваним континуираним ћелијским линијама насталих услед третмана. Применом ових сазнања која говоре о антитуморском потенцијалу препарата Karnozin EXTRA® и Now® L-karnozin на туморским ћелијским линијама дошло се до основе за спровођење даљих претклиничких али и клиничких истраживања а све у сврху будуће терапијске или суплементационе примене код обољења која погађају хуману популацију.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

У истраживању дисертације су коришћене адекватне и вишеструке контроле како би се осигурала робусност резултата и избегло извођење неоснованих закључака. Сваки експеримент је изведен најмање три пута. Самим тиме, мишљење Комисије јесте да нема недостатака у истраживању дисертације који би могли утицати на резултате истраживања.

| |
|--|
| X ПРЕДЛОГ: |
| На основу наведеног, комисија предлаже: |
| а) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана; б) да се докторска дисертација врати кандидату на дораду (да се допуни односно измени); в) да се докторска дисертација одбије. |

Место и датум:
Нови Сад, 03.11.2022.

1. др Ото Барак, редовни професор,

_____, председник

2. др Јасна Мариновић, редовни професор

_____, члан

3. др Небојша Кладар, доцент

_____, члан

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.