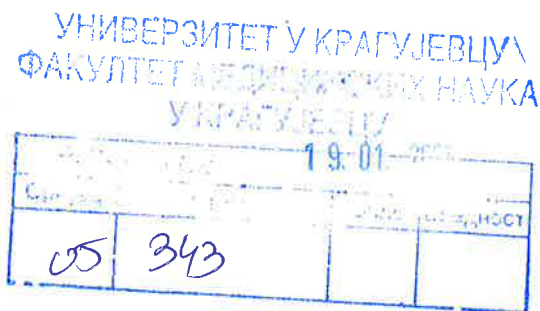


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 19.01.2023. године, одлуком број IV-03-14/18, формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*“ кандидата др Марије Петровић у следећем саставу:

1. ВНС др Сузана Поповић, виши научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. Доц. др Александар Даговић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка онкологија, члан
3. НС др Александра Ристић-Фира, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Марије Петровић и подноси Наставно-научном већу следећи:

2. Извештај комисије о оцени и одбрани завршене докторске дисертације

2.1. Опис докторске дисертације

Докторска дисертација др Марије Петровић под називом „Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*“, која је урађена под менторством Проф. др Данијеле Тодоровић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Генетика, представља оригиналну научну студију која се бави проучавањем ефеката новосинтетисаних комплекса платине(IV) на

инхибицију раста и осетљивост на јонизујуће зрачење малигних ћелија, као и проучавањем ћелијских механизма који до тих промена доводе.

Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Циљ истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Рад садржи 11 слика, 16 табела, и 23 графикана.

У поглављу **Увод**, кандидат је на свеобухватан и јасан начин, цитирајући релевантну литературу, изложио актуелна сазнања о фармаколошким и антитуморским особинама цисплатине и другим, до сада синтетисаним, комплексима платине који имају антитуморско дејство. Прецизно је описан утицај платинских једињења на ћелијски циклус и индукцију процеса апоптозе. Посебна пажња је посвећена примени јонизујућег зрачења у терапији канцера и комбинованим третманима зрачења са цисплатином.

У поглављу **Циљ рада**, јасно су изложени циљ и хипотезе истраживања који су дефинисани у складу са одобреном пријавом докторске дисертације. Главни експериментални задаци су били:

1. Пратити раст и одредити време дупликације ћелијских линија хуманих тумора: карцинома плућа А549, карцинома дојке МСF-7 и меланома НТВ140, као и здраве хумане ћелијске линије фибробласта плућа, МRC-5;

2. Испитати потенцијалну цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине(IV):

1) O,O'-dipentyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate (у даљем тексту комплекс **pentyl-Pt**)

2) O,O'-dibutyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride (у даљем тексту комплекс **butyl-Pt**)

и упоредити са цитотоксичним ефектима cis-diamminedichloroplatinum(II) (у даљем тексту **cis-Pt**) на ћелијским линијама наведених тумора, као и селективност у њиховом деловању у односу на здраву ћелијску линију фибробласта плућа –MRC-5.

3. Испитати утицај комплекса pentyl-Pt и butyl-Pt на пролиферативну активност ћелија током третмана, на индукцију апоптотске ћелијске смрти и експресију протеина који учествују у регулацији апоптозе, као и њихов утицај на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса.

4. Одредити радиобиолошке параметре који дефинишу ефикасност јонизујућег γ зрачења и комбинацију γ зрачења и комплекса pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у елиминацији туморских ћелија.

Материјал и методе докторске дисертације су детаљно и прецизно описани и подударaju се са одобреним приликом пријаве тезе. Описане су ћелијске линије које су коришћене у овом истраживању и начин њихове култивације. Одређено је време дупликације ћелија праћењем њиховог раста у култури до 4. дана након засејавања и бојењем трипан плавим. Криве раста испитиваних ћелијских линија су одређене помоћу колориметријског МТТ теста. Прецизно је описан третман ћелија и тестови за испитивање цитотоксичног ефекта испитиваних комплекса платине, одређивање типа

ћелијске смрти и ефекта на ћелијски циклус третираних ћелија. Дејство екстракта на инхибицију раста туморских ћелија и фибробласта одређивана је 6, 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама комплекса платине у односу на нетретиране ћелије применом МТТ теста и SRB теста. Тип ћелијске смрти одређиван је анализом геномске ДНК изоловане из третираних ћелија, као и методом проточне цитометрије коришћењем Annexin V-FITC/7-AAD. Western blot анализом је праћена еспресија протеина који имају важну улогу у процесу апоптозе: проапоптотског протеина Вах и антиапоптотског протеина Bcl-2. Одређен је и однос ова два протеина, Вах/Bcl-2, који се у процесу апоптозе повећава. Анализа ћелијског циклуса извршена је бојењем ћелија пропидијум-јодидом и мерењем на проточном цитометру. Ефекти јонизујућег зрачења, примењеног самостално или у комбинацији са анализираним комплексима платине, на инхибицију раста и преживљавање третираних ћелија су праћени коришћењем СРБ теста и клоногеног есеја. Утицај на радиосензитивност малигнућ ћелија утврђен је излагањем третираних и нетретираних ћелија γ -зрацима дозом од 1Gу, 2 Gy и 4Gу и одређивањем одговарајућих радиобиолошких параметара. Као извор γ -зрака коришћен је ^{60}Co .

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани кроз 16 табела и 23 графикана. Новосинтетисани комплекси платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, показују дозно и временски зависну инхибицију раста хуманих А549 ћелија карцинома плућа, MCF-7 ћелија карцинома дојке, НТВ140 ћелија малигног меланома и здравих MRC-5 фибробласта. Вредности IC50 за сва три анализирани комплекса указују на велику осетљивост А549 и MCF-7 ћелија на примењене третмане. Најјача инхибиција раста обе ћелијске линије је постигнута третманом butyl-Pt, а најслабија применом cis-Pt. Вредности IC50 за сва три анализирани комплекса указују на слабу осетљивост НТВ140 ћелија на примењене третмане, па су ове ћелије, као резистентне, искључене из даљих истраживања. Сви испитивани комплекси су показали велику селективност према анализираним туморским ћелијама у односу на здраве MRC-5 ћелије. Пролиферативна активност А549 и MCF-7 ћелија опада након третмана. Смањење пролиферације је дозно и временски зависно за све примењене дозе и у свим временским тачкама. У третираним туморским ћелијама сви испитивани комплекси су индуковали апоптотску ћелијску смрт. Комплекси су изазвали фрагментацију молекула ДНК, карактеристичну за процес апоптозе. Цитофлуориметријском анализом је показано да је након третмана дошло до екстернализације фосфатидил серина и везивања анексина, што је карактеристично за апоптотске ћелије. Процент апоптотских ћелија, који је одређен помоћу Annexin-V-FITC/7ADD био је статистички значајно већи у односу на нетретиране контроле, достижући максимум 48h након третмана. Третман је довео до промена у нивоу експресије Bcl-2 и Вах протеина, карактеристичних за апоптозу. Третман А549 и MCF-7 ћелија доводи до заустављања ћелијског циклуса и акумулације ћелија у S фази ћелијског циклуса. Третман А549 и MCF-7 ћелија γ зрачењем доводи до благе инхибиције раста ових ћелија. Хумане А549 ћелије карцинома плућа спадају у групу радиорезистентних ћелија са вредношћу SF2 од 0,71. Хумане MCF-7 ћелије карцинома дојке су такође радиорезистентне са вредношћу SF2 од 0,61. Претретман ћелија

испитиваним комплексима платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, доводи до повећања инхибиције раста у зрачењем свих испитиваних ћелија. Новосинтетисани комплекси платине(IV) и cis-Pt повећавају радиосензитивност испитиваних ћелија на у зрачење, што се огледа кроз промену вредности радиобиолошких параметара SF2, RBE(2Gy) и SER(2Gy). Најјача радиосензитивност обе ћелијске линије је постигнута претретманом butyl-Pt, а најслабија применом cis-Pt.

У поглављу **Дискусија** детаљно су анализирани резултати истраживања. Добијени резултати су дискутовани и упоређивани са литературним подацима из ове области.

У делу **Закључци** јасно су издвојени најважнији резултати и донесени одговарајући закључци.

У поглављу **Литература** цитирано је 199 библиографских јединица. Коришћена литература је адекватна по обиму, садржају и релевантности.

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

Клиничка употреба цисплатине [*cis-diamminedichloroplatinum(II)*] одобрена је 1978. године и до данас је она један од водећих цитостатика у терапији канцера. Упркос великом успеху у лечењу тумора, цисплатина показује и нежељене ефекте попут нефротоксичности, неуротоксичности и хепатотоксичности, а изазива и резистенцију код неких врста тумора. Због тога је важно синтетисати нове комплексе аналога цисплатине и других прелазних метала који показују боље ефекте, мању токсичност и резистенцију од цисплатине. Иако су последњих година испитивани антитуморски ефекти већег броја комплекса платине, тек око 30 комплекса је испитивано у клиничким студијама, а у лечењу тумора се, осим цисплатине, једино употребљавају карбоплатина и оксалиплатина, који представљају другу генерацију антитуморских комплекса платине(II).

Комплекси платине(IV) имају потенцијал као антитуморски агенси, јер делују цитотоксично на малигне ћелије, а имају мање нежељених ефеката од цисплатине и других испитиваних комплекса платине(II):инертинији су, а мања фракција лека бива деактивирана на путу до циљне ћелије. Велики број комплекса платине(IV) је синтетисан уз помоћ различитих лиганата. Променом лиганда мења се липофилност и реактивност једињења. Комплекси платине(IV) су показали цитотоксичну активност на различитим ћелијским линијама хуманих тумора, а само је сатраплатина тренутно у фази клиничког испитивања. Посебно место у досадашњим истраживањима имају комплекси метала са диаминским лигандима, пре свега са лигандима edda типа и њиховим дериватима. Етилендиамин-*N,N'*- диацетат (edda) је тетрадентатни лиганд који поседује по два доhorsка атома азота и кисеоника. Из овог молекула изведен је велики број лиганата (eddp, eddip, (*S,S*)eddp, eddl, eddch и други). Комплекси платине(IV) са edda-типом лиганда су показали антитуморску активност *in vitro*. У зависности од типа ћелија, њихова антитуморска активност је мања, већа или скоро иста у односу на цисплатину. Све ово наводи истраживаче широм света да синтетишу

и испитују једињења која би могла постати бољи цитостатици у смислу активности и селективности према малигним ћелијама, са што је могуће мање нежељених ефеката.

Комбиновани третмани малигнух тумора хемиотерапеутицима и конвенционалним, јонизујућим зрачењем су веома интересантно поље истраживања, јер су добијени резултати контрадикторни: цисплатина код неких тумора (плућа, врата и главе) делује као радиосензитизатор, док код других тумора нема радиосензитизаторску активност или изазива изражене симптоме токсичности код пацијената. Претпоставља се да цисплатина инхибира механизме који исправљају оштећења на молекулу ДНК индукована јонизујућим зрачењем, али тачан механизам деловања још увек није у потпуности разјашњен.

Прелиминарни резултати испитивања цитотоксичних ефеката новосинтетисаних платина(IV) комплекса са лигандима O,O'-dipentyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate и O,O'-dibutyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride на различитим туморским ћелијским линијама показали су да ови агенси остварују исте или боље ефекте од цисплатине. Због свега наведеног циљ овог истраживања је испитивање ефеката наведених новосинтетисаних комплекса платине(IV) на вијабилност и пролиферативну активност туморских ћелија различитог порекла и инвазивности, као и ефекти на индукцију апоптотске ћелијске смрти и регулацију ћелијског циклуса. Због малог броја и контрадикторних података *in vitro* и *in vivo* студија које прате ефекте комбинованих третмана цисплатине и конвенционалног, јонизујућег зрачења на одговор туморских ћелија, од интереса је испитати и ефекте новосинтетисаних платина(IV) комплекса у комбинацији са γ зрачењем.

2.3. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података „PubMed“, „Medline“, „Kobson“, „SCIndex“ помоћу кључних речи „platinum(IV) complexes“, „cisplatin“, „antitumor effects“, „clonogenic survival“, „cell cycle“, „apoptosis“, „ionizing radiation“, нису пронађене студије сличног дизајна и методологије које испитују антитуморске ефекте платина(IV) комплекса са лигандима O,O'-dipentyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate и O,O'-dibutyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride на хуманим ћелијским линијама карцинома плућа - A549, карцинома дојке - MCF-7 и меланома - HTB140, као ни студије о ефектима ових комплекса на индукцију апоптозе и на ћелијски циклус. Такође, није пронађена студија која се бави ефектом комбинованих третмана комплексима платине и γ зрачењем на испитиване ћелијске линије.

На основу ових података, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Марије Петровић под називом „Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на

раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора in vitro” представља резултат оригиналног научног рада.

2.4.Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А Лични подаци

Др Марија Петровић (рођена Радосављевић) је рођена у Крагујевцу 1980. године. Медицински факултет у Крагујевцу је уписала 1998. године, наставила школовање на Медицинском факултету у Београду, где је дипломирала 2006. године са просечном оценом 9,00. Последипломске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу на смеру Клиничка и експериментална фармакологија уписала школске 2006/2007 године, а усмени докторски испит положила у јуну 2010. године са оценом 9. Од 2008. године запослена је у Служби за лабораторијску дијагностику Клиничког центра Крагујевац. У октобру 2014. године положила је специјалистички испит из Клиничке биохемије на Медицинском факултету у Крагујевцу.

Б Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Кандидат је аутор више оригиналних научних радова и први аутор у раду објављеном у часопису индексираном на SCI листи чији су резултати саставни део докторске дисертације, чиме је испунио услов за одбрану докторске дисертације.

Списак радова у часописима:

1. **Petrovic M**, Popovic S, Baskic D, Todorovic M, Đurđević P, Ristic-Fira A, Keta O, Petkovic V, Koricanac L, Stojkovic D, Jevtic V, Trifunovic S, Todorovic D. The effects of newly synthesized platinum(IV) complexes on cytotoxicity and radiosensitization of human tumor cells in vitro. *Anticancer Res.* 2020;40:5001-13. **M23**
2. Stojković DLj, Jevtić VV, Radić GP, Todorović DV, **Petrović M**, Zarić M, Nikolić I, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid. *J Inorg Biochem.* 2015;143:111-6. **M21**
3. Jankovic SM, Aleksic J, Rakovic S, Aleksic A, Stevanovic I, Stefanovic Stoimenov N, **Radosavljevic M**, Kostic M, Tesic D, Petrovic B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of gastrointestinal bleeding among patients on hemodialysis. *J Nephrol.* 2009;22(4):502-7. **M23**

2.5. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наведена докторска дисертација представља оригинално истраживање које се бави испитивањем ефеката новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*. Сprovedено истраживање је у потпуности усклађено са пријављеном темом докторске дисертације. Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Циљеви и хипотезе истраживања, као и примењена методологија, у сагласности су са онима који су одобрени у пријави дисертације. Докторска дисертација је написана на 94 стране, има 11 слика, 23 графикона и 16 табела и садржи следећа поглавља: Увод, Циљ рада, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. У поглављу Литература адекватно је цитирано 199 библиографских јединица из страних и домаћих научних публикација.

На основу наведених чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата Марије Петровић по обиму и квалитету одговара пријављеној теми.

2.6. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Изучавањем карактеристика испитиваних ћелија, добијени су подаци о динамици раста ових ћелија у култури.

- Хумане А549 ћелије карцинома плућа гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност између 5. и 6. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $48,5 \pm 14,9$ h.
- Хумане МСF-7 ћелије карцинома дојке гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност 4. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $48,6 \pm 6,4$ h.
- Хумане НТВ140 ћелије меланома гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност 6. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $32,7 \pm 5,1$ h.
- Хумане, здраве МRC-5 ћелије плућа гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност 7. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $39,5 \pm 5,6$ h.

2. Новосинтетисани комплекси платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, показују дозно и временски зависну инхибицију раста хуманих А549 ћелија карцинома плућа, МСF-7 ћелија карцинома дојке, НТВ140 ћелија малигног меланома и здравих МRC-5 фибробласта.

- Вредности IC50 за сва три анализирана комплекса указују на велику осетљивост А549 и МСF-7 ћелија на примењене третмане. Најјача инхибиција раста обе ћелијске линије је постигнута третманом butyl-Pt, а најслабија применом cis-Pt.

- Вредности IC50 за сва три анализирана комплекса указују на слабу осетљивост HTB140 ћелија на примењене третмане, па су ове ћелије, као резистентне, искључене из даљих истраживања.
 - Сви испитивани комплекси су показали велику селективност према анализираним туморским ћелијама у односу на здраве MRC-5 ћелије.
3. Пролиферативна активност A549 и MCF-7 ћелија опада након третмана. Смањење пролиферације је дозно и временски зависно за све примењене дозе и у свим временским тачкама.
4. У третираним туморским ћелијама сви испитивани комплекси су индуковали апоптотску ћелијску смрт.
- Комплекси су изазвали фрагментацију молекула ДНК, карактеристичну за процес апоптозе.
 - Цитофлуориметријском анализом је показано да је након третмана дошло до екстернализације фосфатидил серина и везивања анексина, што је карактеристично за апоптотске ћелије.
 - Третман је довео до промена у нивоу експресије Bcl-2 и Вах протеина, карактеристичних за апоптозу.
5. Третман A549 и MCF-7 ћелија доводи до заустављања ћелијског циклуса и акумулације ћелија у S фази ћелијског циклуса.
6. Третман A549 и MCF-7 ћелија γ зрачењем доводи до благе инхибиције раста ових ћелија.
- A549 ћелије карцинома плућа спадају у групу радиорезистентних ћелија са вредношћу SF2 од 0,71.
 - MCF-7 ћелије карцинома дојке су такође радиорезистентне са вредношћу SF2 од 0,61.
7. Претретман ћелија испитиваним комплексима платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, доводи до повећања инхибиције раста γ зрачењем свих испитиваних ћелија.
8. Новосинтетисани комплекси платине(IV) и cis-Pt повећавају радиосензитивност испитиваних ћелија на γ зрачење.
- Промена радиосензитивности се огледа кроз промену вредности радиобиолошких параметара SF2, RBE(2Gy) и SER(2Gy).
 - Најјача радиосензитивност обе ћелијске линије је постигнута претретманом butyl-Pt, а најслабија применом cis-Pt.

2.7. Примењивост резултата у теорији и пракси

Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом прате токове савремених истраживања у области проналажења нових антитуморских агенаса и њихове примене.

Резултати овог истраживања указују на могућу примену новосинтетисаних комплекса платине(IV) у терапији канцера, као примарног агенса или као додатне терапије током конвенционалних начина онколошког лечења. Додатна истраживања би укључила проучавање молекуларних механизма антитуморских ефеката ових комплекса, као и истраживања на *in vivo* моделима.

2.8. Начин презентовања резултата научној јавности

Део резултата овог истраживања је објављен у часопису индексираном на SCI листи (категорија M23):

1. **Petrovic M, Popovic S, Baskic D, Todorovic M, Đurđević P, Ristic-Fira A, Keta O, Petkovic V, Koricanac L, Stojkovic D, Jevtic V, Trifunovic S, Todorovic D.** The effects of newly synthesized platinum(IV) complexes on cytotoxicity and radiosensitization of human tumor cells in vitro. *Anticancer Res.* 2020;40:5001-13.

У току је публикавање осталих резултата овог истраживања у истакнутим часописима од међународног значаја.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Марије Петровић под називом „Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*”, на основу свега наведеног оцењује да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Марије Петровић, урађена под менторством Проф. др Данијела Тодоровић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, има оригинални научни и практични значај у потрази за ефикасним антитуморским леком.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, да докторска дисертација под називом „Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*”, кандидата Марије Петровић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

ВНС др Сузана Поповић, виши научни сарадник Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија,
председник



Доц. др Александар Даговић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета
у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка онкологија, члан



НС др Александра Ристић-Фира, научни саветник, Институт за нуклеарне науке
"Винча", Универзитет у Београду, члан



У Крагујевцу, јануар 2023.