

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО:		03. 03. 2023	
Организац.	Број	Датум пријема	Датум одлуке
05	1495		

## 1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 13.09.2022. године, одлуком број IV-03-651/37, формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти моноклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“ кандидата Милице Димитријевић Стојановић у следећем саставу:

1. др Милена Јуришевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник,
2. др Слободанка Митровић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, члан,
3. др Божидар Чобелић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Опита и неорганска хемија*, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Милице Димитријевић Стојановић и подноси Наставно-научном већу следећи:

## 2. Извештај комисије о оцени и одбрани завршене докторске дисертације

### 2.1. Опис докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Милице Димитријевић Стојановић под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти моноклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“, урађена је под менторством проф. др Ивана Јовановића, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија и проф. др Марије Живковић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска органска хемија, и

представља оригиналну научно истраживање које се бави синтезом, карактеризацијом и испитивањем могућих антитуморских ефеката комплекса платине(II) са фенантролинским лигандом.

У поглављу Увод кандидат је прецизно описао карактеристике туморских ћелија, особености карцинома дојке и карцинома колоректума и актуелне терапијске приступе у лечењу. Цитирајући референтну литературу, описани су хемиотерапеутици на бази метала, цисплатина и њени деривати, са посебним освртом на нежељена дејства деривата платине који се у терапијске сврхе користе у медицини.

У поглављу Циљеви и хипотезе истраживања јасно су изложени циљеви и хипотезе који су у складу са одобреним приликом пријаве дисертације. Главни циљ овог истраживања је испитивање антитуморског дејства новосинтетисаних мононуклеарних комплекса платине(II), типа  $[Pt(L)(5,6\text{-ероху-}1,10\text{-phen})]\cdot nH_2O$  ( $n = 1,2$ ), где је L - бидентантно координовани анјон малонске киселине (mal), 2-метилмалонске (Me-mal), 2,2-диметилмалонске (Me<sub>2</sub>-mal) или 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (cbdca) а 5,6-ероху-1,10-phen - бидентантно координовани 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин.

У поглављу „Материјал и методе“ прецизно је наведена методологија која је коришћена током истраживања, а која је у сагласности са предложеном приликом пријаве докторске дисертације. Детаљно је описан процес синтезе и карактеризације одговарајућих комплекса платине(II), типа  $[Pt(L)(5,6\text{-ероху-}1,10\text{-phen})]\cdot nH_2O$  ( $n = 1,2$ ), где је L - бидентантно координовани анјон малонске киселине (mal), 2-метилмалонске (Me-mal), 2,2-диметилмалонске (Me<sub>2</sub>-mal) и 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (cbdca) а 5,6-ероху-1,10-phen - бидентантно координовани 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин. Интеракција новосинтетисаних комплекса платине са молекулом DNA испитивана је помоћу UV-Vis спектрофотометрије. Испитивање везивања за албумин спроведено је применом емисионе флуоресцентне спектроскопије, при константним концентрацијама хуманог серумског албумина и различитим концентрацијама комплекса. Истраживање је осмишљено као експериментална студија на ћелијама *in vitro* и на животињама *in vivo*. Антитуморска активност новосинтетисаних комплекса платине испитивана је *in vitro* МТТ тестом на линијама мишјег карцинома дојке (4Т1), карцинома колона (СТ26), и мезенхималних матичних ћелија миша (mMSCs), као и хуманим ћелијским линијама карцинома колона (НСТ 116), карцинома плућа (А549) и карцинома дојке (MDA-MB-468).

Проточном цитометријом анализирана је апоптотска смрт, експресија антиапоптотских протеина, проценат ћелија које садрже активну каспазу-3, као и експресија маркера пролиферације, Ki-67, у туморским ћелијама испитиваних линија након излагања испитиваном комплексу. Тест миграције или "Scratch" тест је коришћен за анализу миграције туморских ћелија *in vitro*. Са циљем да се испита да ли постоји корелација између резултата добијених на културама ћелија и ефеката у живом систему, спроведена су *in vivo* испитивања на мишјем моделу карцинома дојке. Мишеви женског пола, соја BALB/c, старости од 8 до 12 недеља, третирали су интраперитонеално комплексом Pt3 у дози од 10mg/kg, ресуспендован у 200  $\mu$ L физиолошког раствора, у режиму од укупно 5 доза, почев од дана палпације тумора, на трећи дан. Раст палпабилног примарног карцинома дојке праћен је свакодневно, током 24 дана. Мишеви су жртвовани, крв је узета за биохемијске анализе, а узорци плућа, јетре, срца и бубрега након одговарајуће припреме анализирани су микроскопирањем. Степен оштећења паренхима јетре, бубрега, срца и плућа одређиван је семиквантитативно на основу патохистолошких скорова доступних у литератури.

Резултати истраживања детаљно су и јасно приказани табелама (укупно 8), фигурама (укупно 29), сликама (укупно 2) и једном схемом. На основу изнетих резултата круцијални закључак је да комплекс [Pt(Me<sub>2</sub>-met)(5,6-ероку-1,10-phen)] (Pt3) поседује значајну цитотоксичку активност против ћелија карцинома дојке, колоректалног карцинома и карцинома плућа *in vitro*, као и *in vivo* антитуморску активност у ортотопском 4T1 моделу мишјег карцинома дојке, без значајне токсичности за јетру, бубреге, плућа и срце у поређењу са цисплатином.

У поглављу „Дискусија“ детаљно су анализирани добијени резултати истраживања и упоређивани са литературним подацима из исте области. Добијени резултати су дискутовани у контексту сличних али и различитих резултата других аутора.

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

Обзиром на стални тренд пораста учесталости свих врста карцинома а посебно карцинома дојке и колоректума, како у Србији, тако и у свету, значај проналаска нових модалалитета лечења ставља се у први план. Досадашњи терапијски протоколи показали

су неселективну ефикасност, али поред жељеног ефекта на туморске ћелије, оштећења неизмењених здравих ћелија била су неминовна. Штетни ефекти примене антитуморских агенаса, нису се могли избећи. Проналазак нових терапијских агенаса који би били ефикасни као конвенционални цитостатици, пре свега цисплатина, а притом мање токсични или идеално нетоксични, је велики изазов садашњице.

Последњих година се за добијање алтернативних комплекса платине користи велики број органских и неорганских лиганата. Избор лиганда је круцијалан обзиром да играју важну улогу у модификацији реактивности и липофилности новосинтетисаних једињења. Фенантролин је класичан планарни хелатни лиганд за јоне прелазних метала и један од најчешће коришћених лиганата у савременој координационој хемији. Постоје литературни подаци који указују да фенантролин поседује антимикробну активност као и извесну антитуморску активност, али и да инхибира активност матриксних металопротеиназа. Имајући у виду наведене чињенице главни циљ овог истраживања је испитивање антитуморског дејства новосинтетисаних мононуклеарних комплекса платине(II), типа  $[Pt(L)(5,6\text{-epoxy-1,10-phen})] \cdot nH_2O$  ( $n = 1,2$ ), где је L - бидентантно координовани анјон малонске киселине (mal), 2-метилмалонске (Me-mal), 2,2-диметилмалонске (Me<sub>2</sub>-mal) или 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (cbdca) а 5,6-епокси-1,10-phen - бидентантно координовани 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин. Спроведено истраживање по први пут показује да новосинтетисани комплекс платине(II) са фенантролином- Pt3, поседује значајну цитотоксичку активност против ћелија карцинома дојке и колоректалног карцинома *in vitro*, као и *in vivo* антитуморску активност у ортотопском 4T1 моделу мишијег карцинома дојке, без значајне токсичности за јетру, бубреге, плућа и срце.

### **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“, претраживањем кључних речи: „apoptosis“, „breast cancer growth“, „cytotoxicity“, „platinum(II) complexes“, „malonic acids“, „phenanthroline“ „toxicity“ нису пронађене студије које су се бавиле испитивањем биолошке активности мононуклеарних фенантролинских комплекса платине(II) на мишијем моделу карцинома дојке. Студија која је предмет ове докторске дисертације је до сада прва која је обухватила

синтезу, карактеризацију као испитивање биолошке активности моноклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II) *in vitro* као и у анималном моделу карцинома дојке.

На основу ових података, Комисија констатује да докторска досертација кандидата Милице Димитријевић Стојановић под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти моноклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“ представља резултат оригиналног научног рада.

## **2.4. Преглед оставрених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

### **А. Лични подаци**

Милица Димитријевић Стојановић, доктор медицине, рођена је 29.9.1988. године у Књажевцу. Основну школу је завршила у Сокобањи, а средњу медицинску школу у Прокупљу као носилац дипломе „Вук Стефановић Караџић“. Факултет медицинских наука у Крагујевцу је уписала школске 2007/2008. године, а дипломирала 19.9.2013. године на студијском програму Интегрисане академске студије медицине са просечном оценом 9,22. Стручни испит је положила 27.5.2014. године. Школске 2009/2010. и 2010/2011. године је обављала дужности студента демонстратора на предмету Микробиологија и имунологија. Школске 2013/2014. године је уписала Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на изборном подручју Имунологија, инфекција и инфламација. 29.9.2016. године је положила усмени докторски испит са оценом 9. Од децембра 2018. године запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у звању истраживач приправник. Од фебруара 2019. године била је ангажована као фацитатор практичне наставе на Катедри за Патолошку анатомију. Дана 6.3.2020. године изабрана у звање сарадник у настави за ужу научну област Патолошка анатомија. Специјалистички стаж из Патологије започела је 1.9.2020. године. Пријавила је докторску дисертацију под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти моноклеарних 5,6-епокси-5,6 дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“ дана 14.07.2021. године. Од 01.02.2022. године и даље ангажована као сарадник у звању асистента за ужу научну област Патолошка анатомија.

## **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 испунила услов за одбрану докторске дисертације.

Списак радова у часописима:

1. **Dimitrijević Stojanović MN**, Franich AA, Jurišević MM, Gajović NM, Arsenijević NN, Jovanović IP, Stojanović BS, Mitrović SL, Kljun J, Rajković S, Živković MD. Platinum(II) complexes with malonic acids: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo antitumor activity and interactions with biomolecules. *J Inorg Biochem.* 2022;231:111773. **M21**
2. Harrell CR, Pavlovic D, Miloradovic D, **Stojanovic MD**, Djonov V, Volarevic V. "Derived Multiple Allogeneic Protein Paracrine Signaling (d-MAPPS)" Enhances T Cell-Driven Immune Response to Murine Mammary Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2022;2022:3655595. **M22**
3. Stojanovic B, Jovanovic I, Stojanovic BS, **Stojanovic MD**, Gajovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. *Eur J Immunol.* 2019;49(6):940-946. **M21**

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

Сprovedено истраживање је у складу са пријављеном темом докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија су у сагласности са онима које су одобрени у пријави тезе. Докторска дисертација кандидата Милице Димитријевић Стојановић садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви и хипотезе истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Написана је на 129 страна и садржи 4 слике, 12 табела, 35 фигура и једну схему. У поглављу Литература цитирано је 416 библиографских јединица из иностраних и домаћих стручних/научних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, комисија сматра да завршена докторска дисертација под називом **„Синтеза, карактеризација и потенцијални**

антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“ по обиму и квалитету у потпуности одговара пријављеној и одобреној теми докторске дисертације.

## 2.6 Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати су садржани у следећим закључцима:

- Структура новосинтетисаних комплекса је потврђена на основу резултата елементалне микроанализе, NMR (1H и 13C) и IR спектроскопије, као и UV-Vis спектрофотометије. Структура комплекса Pt3, [Pt(Me2-met)(5,6-epoxy-1,10-phen)], који је добијен у кристалном облику потврђена је на основу рендгенске структурне анализе.
- Комплекси се везују за CT-DNK, али слабије од класичног интеркалатора. Јачина интеракција зависи од утицаја стерног ефекта анјона дикарбоксилне киселине координоване за платина(II) јон.
- Испитивани комплекси интеркалирају између два нуклеотидна ланца уз истискивање етидијум-бромида. Интеркалација комплекса је потврђена и на основу мерења вискозитета, при чему се вискозитет раствора CT-DNA благо повећања са порастом концентрације додатог комплекса.
- Испитивани мононуклеарни комплекси платине(II) показују добар афинитет за везивање за говеђи серум албумин (BSA).
- На испитиваним линијама туморских ћелија, новосинтетисани комплекси платине(II) показују дозно зависну цитотоксичност и јачу селективност према туморским ћелијама у односу на мезенхималне матичне ћелије, у поређењу са цисплатином и карбоплатином.
- Pt3 комплекс повећава проценат ћелија карцинома дојке и колона у раној и касној апоптози.
- Pt3 комплекс смањује експресију антиапоптотских молекула Bcl-2 и BclXL и повећава експресију каспазе-3 у испитиваним линијама туморских ћелија.
- Pt3 комплекс инхибира пролиферацију и миграцију туморских ћелија.
- Pt3 комплекс успорава раст примарног тумора дојке и значајно мање је токсичан, *in vivo*, у односу на цисплатину.

## 2.7 Примењивост резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања омогућавају разумевање антитуморских ефеката новосинтетисаних мононуклеарних комплекса платине уз оригиналан научни допринос. Откриће антитуморских ефеката новосинтетисаних мононуклеарних комплекса платине је значајно ради даљих истраживања у области хемије, фармакологије и онкотерапије, обзиром на забележене мање системске токсичне ефекте у поређењу са референтним стандардима. Ова дисертација пружа нова сазнања за подстицање даљих истраживања у области кординовања метала са лигандима од фармаколошког значаја, а са циљем да се отворе нове терапијске могућности у експерименталној терапији карцинома дојке и колоректума.

## 2.8 Начин презентовања резултата научној јавности

Резултати овог истраживања су објављени у часопису индексираном на SCI листи категорије M21.

**Dimitrijević Stojanović MN, Franich AA, Jurišević MM, Gajović NM, Arsenijević NN, Jovanović IP, Stojanović BS, Mitrović SL, Kljun J, Rajković S, Živković MD.** Platinum(II) complexes with malonic acids: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo antitumor activity and interactions with biomolecules. *J Inorg Biochem.* 2022;231:111773. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111773. **M21 (2021)**



## ЗАКЉУЧАК

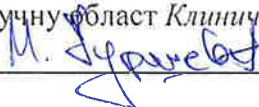
Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Милице Димитријевић Стојановић под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“ на основу свега наведеног оцењује да је истраживање адекватно планирано и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Милице Димитријевић Стојановић, под менторством проф. др Ивана Јовановића и проф. др Марије Живковић, има оригинални научни допринос и практични значај у потрази за ефикаснијим антитуморским лековима на бази метала.

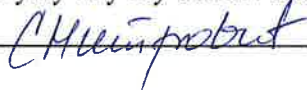
На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“ кандидата Милице Димитријевић Стојановић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

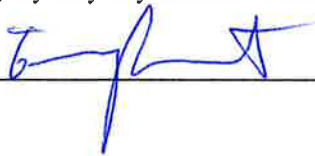
др Милена Јуришевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник,



др Слободанка Митровић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Патолошка анатомија*, члан,



др Божидар Чобелић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан.



У Крагујевцу, фебруар 2023. године