

ОБРАЗАЦ 6

ПРЕДЛОЖБА		17. 04. 2024	
Орг. јед.		ПРЕДЛОЖБА	
05	3886		

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 19.2.2024. године (број одлуке: IV-03-90/23) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Антитуморска и антимикуробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)”, кандидата Сање Зорнић, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за коју је именован ментор проф. др Јелена Пантић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације:
Антитуморска и антимикуробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са знаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикона, једначина и референци) (до 500 карактера):
Докторска дисертација кандидата Сање Зорнић представља оригиналну научну студију у којој су испитани антитуморски и антимикуробни ефекти различитих динуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II). Докторска дисертација је написана на 114 страна и садржи 7 поглавља: Увод, Циљ и хипотезе, Материјал и методе, Резултате, Дискусију, Закључке и Литературу. Теза садржи 16 слика, 17 табела и 19 графикона. Поглавље Литература садржи 292 библиографске јединице иностраних и домаћих научних публикација.
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):
У овој докторској дисертацији динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним N-хетероцикличним мостним лигандима су хемијски охарактерисани и испитан је њихов туморицидни потенцијал на

различitim ћелијским линијама тумора, као и антимикуробни ефекат на више врста бактерија и гљивица. Осим тога, анализирани су и потенцијални молекулски механизми њихове антитуморске активности.

1.4. Анализа испуњености полазних хипотеза:

У складу са постављеним хипотезама студије да динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима испољавају значајну цитотоксичку активност на различитим ћелијама тумора мишјег и хуманог порекла, као и антибактеријски и антигљивични ефекат на различитим сојевима микроорганизама, у студији су анализирани биолошки ефекти синтетисаних комплекса. Резултати су документовали значајан туморицидни потенцијал испитиваних комплекса, као и потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином као конвенционалним хемиотерапеутиком. Комплекс $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$, означен као C2, показао је највећу дозно и временски зависну цитотоксичку активност *in vitro*, нарочито на ћелијама мишјег и хуманог карцинома дојке. Анализа потенцијалних механизма туморицидног дејства комплекса C2 је указала на значајан проапоптотски и антипролиферативни ефекат испитиваног комплекса. Међутим, ефекат комплекса C2 на раст мишјег карцинома дојке *in vivo* је изостао, што се потенцијално може објаснити slabим везивањем испитиваног комплекса за биомолекуле и његовим ограниченим допремањем у туморско ткиво. Осим тога, испитивани комплекси су показали умерен антибактеријски и антигљивични ефекат у зависности од врсте микроорганизама, али и њихове хемијске структуре.

1.5. Анализа примењених метода истраживања:

У поглављу Материјал и методе је најпре описан поступак синтезе и хемијске карактеризације динуклеарних комплекса Pt(II) са општом формулом $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$, где је L диамински лиганд: 1,2-пропилендиамин (C1), изобутилендиамин (C2), 1,3-пропилендиамин (C3) или 1,3-пентандиамин (C4), као и динуклеарних комплекса Pd(II) са општом формулом $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-L)](NO_3)_2$, где је L диазински лиганд и то: пиразин (C5), пиримидин (C6), пиридазин (C7) или феназин (C8). Затим је описан поступак анализе интеракција синтетисаних комплекса са биомолекулима као што су DNK, BSA (енгл. *Bovine Serum Albumin*) и HSA (енгл. *Human Serum Albumin*). Цитотоксички ефекат је испитан на ћелијским линијама карцинома дојке (4T1 и MDA-MB 468), плућа (LLC1 и A549) и меланома (B16-F10 и A375), мишјег и хуманог порекла, као и на нетуморској ћелијској линији хуманих фибробласта (MRC-5), након излагања испитиваним комплексима у трајању од 48 h и 72 h. Као референтни цитостатик је коришћена цисплатина. Антимикуробни ефекат на неколико референтних сојева *Gram*-позитивних и *Gram*-негативних бактерија, као и гљивица је испитан микродилуционом бујон методом. За даљу анализу потенцијалних антитуморских механизма је изабран комплекс са општом формулом $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$, означен и као C2, који је показао најбољи дозно и временски завистан цитотоксички ефекат, нарочито на ћелијским линијама хуманог и мишјег карцинома дојке. Различитим методама испитан је ефекат комплекса C2 на тип ћелијске смрти и пролиферацију туморских ћелија одређивањем експресије молекула укључених у регулацију смрти ћелије и ћелијског циклуса. Методом проточне цитометрије је анализирана експресија *Annexin*-a V и пропиридијум јодида и одређена процентуална заступљеност апоптотских и некротичних ћелија, анализиран је ћелијски циклус и одређена процентуална заступљеност туморских ћелија које експримирају циклин E и фосфорилисану протеин киназу АКТ. Методом qRT-PCR уз коришћење одговарајућих прајмера, детектована је експресија iRNK за синтезу каспазе 3, каспазе 9, циклина D3, RIPK1, p27 и cMyc. За анализу *in vivo* ефекта комплекса C2 коришћени су BALB/c мишеви женског пола којима су инокулисане 4T1 ћелије мишјег карцинома дојке, а раст тумора и преживљавање праћени континуирано.

1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

У складу са општим циљем студије, као и конкретним експерименталним задацима, синтетисани су и хемијски окарактерисани динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним N-хетероцикличним мостним лигандима, а затим испитана природа њихове интеракције са биомолекулима као што су што су DNK, BSA и HSA, као и потенцијални биолошки ефекти. Цитотоксички потенцијал динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II) тестиран је на линијама ћелија различитих врста солидних тумора мишјег и хуманог порекла *in vitro*, док је њихово антимикуробно дејство испитано користећи различите сојеве бактерија и гљивица. Затим су анализирани молекулски механизми антитуморског дејства комплекса C2, који је показао највећи туморицидни потенцијал, евалуацијом ефекта испитиваног комплекса на механизме ћелијске смрти и ћелијски циклус, као и експресију различитих молекула укључених у регулацију пролиферације и преживљавања туморских ћелија. Потенцијални ефекат комплекса C2 *in vivo*, анализиран је коришћењем експерименталног модела мишјег карцинома дојке.

1.7. Анализа добијених резултата истраживања и списак објављених научних радова кандидата из докторске дисертације (аутори, наслов рада, волумен, година објављивања, странице од-до, DOI број¹, категорија):

У делу резултата који се односе на анализу хемијских карактеристика добијених комплекса и начина њихове интеракције са биомолекулима је показано да испитивани комплекси Pt(II) нису добри интеркалатори и остварују слабе интеракције са биомолекулима попут DNK, BSA и HSA, које доминантно одговарају електростатичким везама. У поређењу са другим испитиваним комплексима Pt(II), а насупрот израженој цитотоксичности, уочено је да комплекс C2 формира најслабије везе са биомолекулима. Динуклеарни комплекси Pd(II) се потенцијално везују за DNK путем интеркалације, док са BSA доминантно остварују електростатичке везе. Међу испитиваним комплексима Pd(II), комплекс C8 формира најјаче везе са молекулом DNK, док се комплекс C6 најинтензивније везује за молекул BSA.

Даље је истраживање било усмерено на испитивање биолошке активности добијених једињења. Показано је да међу испитиваним комплексима Pt(II), комплекс C2 испољава значајан дозно и временски зависан цитотоксички ефекат на ћелијама мишијих карцинома дојке (4T1) и плућа (LLC1). Комплекси C1 и C2 су показали значајну туморицидну активност на MDA-MB 468 ћелијама хуманог карцинома дојке, уз потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином. Међу испитиваним динуклеарним комплексима Pd(II), комплекси C7 и C8 су испољили већу туморицидну активност, нарочито на линијама ћелија хуманог карцинома дојке (MDA-MB 468), као и меланома (A375), уз потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином. Изражена туморицидна активност комплекса C8 показана је на ћелијама хуманог аденокарцинома плућа (A549) и посебно ћелијама A375 хуманог меланома где је кореспондирала са ефектом цисплатине

Осим тога, анализа антимикуробне активности испитиваних комплексних једињења је показала да динуклеарни комплекси Pt(II) испољавају слабу до умерену антимикуробну активност у зависности од врсте микроорганизама. Испитивани комплекси су показали умерен антибактеријски ефекат на неколико врста *Gram*-позитивних бактерија, а нарочито на *Rhodococcus equi* и *Streptococcus pneumoniae*, док су комплекси C1, C2 и C3 показали значајан антигљивични ефекат на квасницу *Candida albicans*. Динуклеарни комплекси Pd(II) су показали слаб до умерен антимикуробни ефекат који је зависио од врсте микроорганизама, али и од хемијске структуре тестираних комплекса, с обзиром да је комплекс C8 испољио највећи антимикуробни потенцијал. Сви испитивани комплекси су били цитотоксични за *Gram*-позитивну бактерију

¹ Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

Rhodococcus equi, док су C6, C7 и C8 показали антибактеријско дејство на врстама *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus saprophyticus*. Комплекс C7 и посебно комплекс C8 су показали значајну антифунгалну активност против кваснице *Candida albicans*.

У даљем току истраживања евалуирани су потенцијални механизми туморицидне активности комплекса C2, који је показао највећи цитотоксички ефекат *in vitro*. Закључено је да испитивани комплекс индукује унутрашњи пут апоптозе ћелија карцинома дојке што је документовано повећаним процентом раноапоптотичних ћелија, као и повећаном експресијом каспазе 3 и каспазе 9 у третираним туморским ћелијама. Осим тога, показано је да комплекс C2 подстиче акумулацију ћелија карцинома дојке у суб-G1 фази ћелијског циклуса што указује на апоптозу туморских ћелија. Поред проапоптотског, документовано је и да комплекс C2 испољава антипролиферативни ефекат тако што утиче на експресију регулатора ћелијског циклуса, односно смањује експресију циклина D3 и циклина E, а повећава експресију инхибитора циклин зависних киназа p27. Проапоптотски и антипролиферативни ефекат комплекса C2 на 4T1 ћелијама мишијег карцинома дојке, се додатно огледа у смањеној експресији онкогена cMyc и фосфорилисане протеин киназе АКТ, укључених у регулацију пролиферације и смрти туморских ћелија.

Међутим, у експерименталном моделу мишијег карцинома дојке је уочено да комплекс C2 није утицао на смањење раста тумора. Закључено је да би изостанак ефекта испитиваног комплекса *in vivo* могао бити последица његовог слабог везивања за нетранспортно место протеина, отежаног транспорта кроз крвоток и следствено лимитираног допремања у туморско ткиво. У закључку је истакнуто да су резултати студије указали на значајан потенцијал динуклеарних комплекса Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарних комплекса Pd(II) са ароматичним N-хетероцикличним мостним лигандима за развој антитуморске и потенцијално антимикробне терапије, као и потребу за даљим хемијским модификацијама у циљу побољшања њихове биолошке активности, нарочито ефеката *in vivo*.

Резултати из докторске дисертације су публиковани у два оригинална научна рада:

1. Zornić S, Simović Marković B, Franich AA, Janjić GV, Jadranin MB, Avdalović J, Rajković S, Živković MD, Arsenijević NN, Radosavljević GD, Pantić J. Characterization, modes of interactions with DNA/BSA biomolecules and anti-tumor activity of newly synthesized dinuclear platinum(II) complexes with pyridazine bridging ligand. *J Biol Inorg Chem* 2023. doi.org/10.1007/s00775-023-02030-0. (M21)
2. Zornić S, Simović Marković B, Franich AA, Živković MD, Luković B, Arsenijević NN, Radosavljević GD, Rajković S, Pantić J. Synthesis, characterization, DNA/BSA-binding affinity and biological activity of dinuclear palladium(II) complexes with aromatic N-heterocyclic bridging ligand. *J Coord Chem* 2024. doi.org/10.1080/00958972.2023.2301402. (M23)

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 претраживањем биомедицинских база података „Medline“ и „KoBSON“, уз коришћење одговарајућих кључних речи „dinuclear Pt(II) complexes“, „dinuclear Pd(II) complexes“, „tumoricidal activity“, „antimicrobial activity“, „apoptosis“, нису пронађене студије истог дизајна и методологије.

Извештај о провери докторске дисертације на плагијаризам је показао минималан степен неопходног преклапања текста и то само као последица навођења библиографских података о коришћеној литератури или општих података у методологији који се подударају са методологијом коришћеном у сличним истраживањима. Осим тога, у целини су поштована сва академска правила која се односе на цитирање резултата истраживања других аутора.

методологијом коришћеном у сличним истраживањима. Осим тога, у целини су поштована сва академска правила која се односе на цитирање резултата истраживања других аутора.

Сходно наведеном, Комисија константује да докторска дисертација кандидата Сање Зорнић под називом „**Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)**” представља резултат оригиналног научног рада.

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

Због пораста броја оболелих од малигнух болести, приоритет у савременој медицини представља истраживање нових антитуморских лекова. Терапија малигнух болести је углавном праћена озбиљним нежељеним ефектима, што указује на неопходност истраживања нових потенцијалних терапеутика који би остварили сличан туморицидни ефекат као до сада познати антитуморски лекови, али са мање нежељених дејстава. Такође, пораст резистенције микроорганизама на антимикробне лекове, указао је на потребе за интензивним испитивањима нових антимикробних лекова. Комплексна једињења Pt(II) су већ дуго позната у металотерапији тумора, а сами почеци развоја антитуморске терапије везани су управо за откриће туморицидне активности цисплатине као мононуклеарног комплекса Pt(II). У актуелним истраживањима биолошких ефеката комплексних једињења прелазних метала, значајну улогу играју комплекси Pt(II), као и комплекси Pd(II), који би потенцијално могли имати сличне ефекте уз мању токсичност. Због своје способности да граде комплексе са различитим једињењима са потенцијалним антитуморским дејством, синтеза и модификације биоактивних једињења Pt(II) и Pd(II) су веома актуелне последњих деценија. До данас, бројна новосинтетисана и модификована комплексна једињења Pt(II) су испољила цитотоксички, антипролиферативни, проапоптотски и антиангиогени ефекат, уз потенцијално већу селективност за туморске ћелије.

У овој студији документовани су значајни антитуморски и антимикробни ефекти различитих динуклеарних комплекса Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарних комплекса Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима, на различитим линијама туморских ћелија мишијег и хуманог порекла, односно различитим сојевима *Gram*-позитивних и *Gram*-негативних бактерија, као и гљивица. Значајан туморицидни потенцијал комплекса C2 базиран је на његовом проапоптотском и антипролиферативном дејству на ћелије карцинома дојке. Међутим, анализе интеракције комплекса C2, $[Pt(ibn)Cl]_2(\mu-pydz)Cl_2$, са биомолекулима, као и изостанак ефекта на раст тумора *in vivo*, су указале на могућност модификација које би утицале на његову већу ефикасност. Генерално, валидан туморицидни и антимикробни потенцијал испитиваних комплексних једињења Pt(II) и Pd(II) указује на могућност даљих модификација у циљу побољшања њихове биолошке активности и потенцијалне терапијске примене.

1.10. Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):

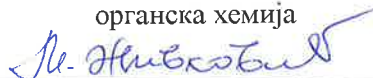
На основу анализе достављене документације Комисија константује да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације кандидата Сање Зорнић под називом „**Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)**” у складу са студијским програмом Докторских академских студија, општим актом Факултета и општим актом Универзитета.

2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)”, кандидата Сање Зорнић, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:

Проф. др Марија Живковић, ванредни професор
Факултета медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска
органска хемија



Председник комисије

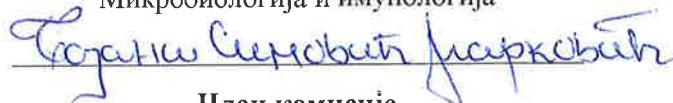
Проф. др Божидар Чобелић, ванредни професор
Хемијског факултета Универзитета у Београду за
ужу научну област Неорганска хемија



Члан комисије

ВНС Бојана Симовић Марковић, виши научни
сарадник

Факултета медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу за ужу научну област
Микробиологија и имунологија



Члан комисије