

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕН		20. 05. 2020	
Орг. јед.		Сектор	Одност.
05	3680-1		

ОДЛУКА ВЕЋА ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У
КРАГУЈЕВЦУ О ФОРМИРАЊУ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ
ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-9/19 од 22.01.2020. године, именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на хелије карцинома дојке *in vitro*”, кандидата др Ненада В. Марковића, у следећем саставу:

1. Доц. др Марија Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, председник
2. Проф. др Наташа Петронијевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Медицинска и клиничка биохемија, члан
3. Доц. др Марко Спасић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Ненада В. Марковића и подноси Наставно - научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

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

Докторска дисертација кандидата др Ненада В. Марковића под насловом „Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro*” урађена под коменторством проф. др Срђана Нинковића ванредног професора Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија и доц. др Милана Зарића, доцента Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, представља оригиналну студију која се бавила испитивањем цитотоксичног ефекта новосинтетисаних комплекса платине на ћелијске линије карцинома дојке.

Ризик оболевања од карцинома дојке у току живота износи око 12,4%, што значи да једна од осам жена оболи од ове болести. Глобално, учесталост карцинома дојке је око 25% у односу на друга дијагностикована малигна обољења (до 28% у најразвијенијим земљама) уз стопу морталитета од 14-15%. У Србији, 20,2% оболелих и 18,2% умрлих жена због малигнух тумора има дијагнозу карцинома дојке.

Међу првима од рутински примењиваних деривата платине, цисплатина (*cis*-диаминдихлоридоплатина(II)) било у моно или комбинованој терапији са другим агенсима већ три деценије фигурира у онколошкој терапији карцинома дојке. Међутим, као и сваки лек и цисплатина има своје недостатке и ограничења, а то је њено токсично дејство, ограничена растворљивост и појава резистенције након дуже примене. Да би се превазишли недостаци цисплатине, а посебно токсичност, синтетисан је велики број комплекса платине(II) као што су карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, лобаплатина и хептаплатина. Још већи помак је направљен синтезом комплекса који садрже два или више јона платине повезаних мостним лигандима, тзв. полинуклеарни комплекси платине. Ови последњи чине трећу генерацију деривата платине и на њих туморске ћелије показују мању резистенцију. Њихов катјонски облик их чини хидросолубилнијим у односу на неутралне комплексе што њихову способност за интеракције са протеинима ћелије чини израженијом.

Биолошки ефекат цисплатине се испољава везивањем за ДНК и протеине инхибирајући транскрипцију и ДНК репликацију што резултира апоптозом и/или

некрозом ћелија па је сврстана у терапијску шему различитих тумора. Побољшањем растворољивости у води цисплатине синтетисана је оксалиплатина (*cis-L*-диаминциклохексаноксалатоплатина(II)) што јој омогућава да своје дејство остварује интензивнијим интеракцијама са РНК и протеинима. Савремене смернице као стандардни приступ у лечењу узнапредовалог, метастатског и троструко негативног карцинома дојке (*triple negative*) наводе комбинацију оксалиплатине и гемцитабина. Иако је клиничка примена оксалиплатине повећала петогодишње преживљавање оболелих од узнапредовалог карцинома дојке на 35 до 50% као и да смањује појаву метастаза код 20 до 30% лечених, и даље у 40% случајева долази до развоја резистенције на терапију. Неуротоксичношћу изазвана сензорна неуропатија, али и развој резистенције на лек су условили развој нових терапијских приступа у лечењу карцинома дојке. Обзиром да је показано да динуклеарни комплекси платине(II) испољавају значајнији антитуморски ефекат у поређењу са цисплатином, у овом раду је испитиван антитуморски потенцијал новосинтетисаних комплекса тог типа користећи ћелијску линију 4T1 карцинома дојке миша и ћелијску линију хуманог карцинома дојке MDA-MB-231.

Резултати докторске дисертације су показали да оба испитивана комплекса платине делују цитотоксично на ћелије карцинома дојке *in vitro*. Такође, показано је да је доминантан тип ћелијске смрти којим долази до смањења вијабилности туморских ћелија, апоптоза. Новосинтетисани комплекси платине заустављају ћелијски циклус туморских ћелија у различитим фазама, чиме се успорава мултипликација туморских ћелија, а показано је и да долази до промене односа Bcl-2/Bax и активације каспазе-3 у туморским ћелијама карцинома дојке миша и човека, што доводи до активације унутрашњег, митохондријалног пута апоптозе. Резултати овог истраживања указују да новосинтетисани комплекси платине, а нарочито комплекс 1 има обећавајућу улогу као потенцијални хемотерапеутик што би неким будућим истраживањима требало да буде потврђено.

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

Претрагом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „Medline” и „KoBSON” помоћу следећих кључних речи: 4T1, MDA-MB-231, карцином дојке, динуклеарни комплекси платине(II), нису

пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа у смислу хемијског једињења које је само за сврху ове дисертације синтетисано и окарактерисано. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Ненада В. Марковића под називом „Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro*“, представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Доктор Ненад В. Марковић је рођен 22.07.1984. у Крагујевцу. Основну и средњу медицинску школу у Крагујевцу је завршио као носилац дипломе Вук Караџић. Дипломирао на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 2010 године. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао школске 2011/2012 на смеру Клиничка и експериментална хирургија. Усмени докторски испит положио 2013. године. Новембра 2018. године пријавио тему докторске дисертацијена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Ангажован као сарадник у настави на Катедри за Анатомију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу 2012-2014 године. Као фацилитатор у настави на предмету Хирургија Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу 2016, а затим од 2017. године и даље у звању истраживач приправник на Катедри за Хирургију. Специјализант је абдоминалне хирургије. Члан је српског лекарског друштва, панкреасног клуба и Удружења ендоскопских хирурга Србије. Говори течно енглески језик и има висок ниво знања рада на рачунару.

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

1. **Marković N, Zarić M, Živković MD, Rajković S, Jovanović I, Arsenijević N, Čanović P, Ninković S.** Novel Platinum(II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells In Vitro. *ChemistrySelect*. 2019;4(44):12971-7. **M23**

2. **Markovic N**, Lukovic A, Arsenijevic N, Ninkovic S, Ljubic B. The Role of Tumor Microenvironment and Impact of Cancer Stem Cells on Breast Cancer Progression and Growth. Ser J Exp Clin Res. 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0018. **M51**
3. Jovanović J, Jeremić D, Jovanović B, Vulović M, Sazdanović P, Sazdanović M, Ognjanović N, Stojadinović D, Jeremić K, **Marković N**, Živanović-Mačužić I. Nasal morphological characteristics of the Serbian population. Arch Biol Sci. 2014;66(1):227-32. **M23**

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

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду су остали исти. Примењена методологија истраживања је идентична са одобреном. Докторска дисертација др Ненада В. Марковића садржи следећа поглавља: увод, циљеве истраживања, материјал и методе, резултате, дискусију, закључак и литературу.

У уводном делу кандидат је, цитирајући релевантну литературу, детаљно објаснио познате чињенице у вези са етиологијом и патогенезом карцинома дојке. Посебна пажња је посвећена досадашњим достигнућима у пољу хемиотерапије нарочито код резистентних и агресивних форми болести као што је троструко негативни тип карцинома дојке код кога су примењивани деривати платине.

Након јасно дефинисаних циљева истраживања и хипотеза студије, који се поклапају са онима одобреним приликом пријаве тезе, кандидат је детаљно описао методологију извођења истраживања. Материјал и методе рада детаљно су и прецизно написани, и поклапају се са подацима изнетим у пријави тезе. Ово поглавље реализовано је кроз детаљно објашњење свих примењених метода рада, а које укључују: Синтеза полазног мононуклеарног $[Pt(en)Cl_2]$ комплекса; Синтезе динуклеарних $[Pt(en)Cl]_2(\mu-1,7-phen)(ClO_4)_2$ и $[Pt(en)Cl]_2(\mu-4,7-phen)(ClO_4)_2$ комплекса; Елементална микроанализа; Инфрацрвена спектроскопија; Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија; Ћелијске културе и комплекси; Тестови цитотоксичности и апоптозе; Анализа ћелијског циклуса.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани. Најпре је учињена детаљна елементарна микроанализа а затим и инфрацрвена и нуклеарно-магнетно-резонанциона спектрофотометрија ових комплекса K1 и K2. Резултатима

МТТ теста је учињена анализа цитотоксичности комплекса на 4Т1 мишћу и MDA-MB-231 хуману ћелијску линију. Ови резултати су поређени са цитотоксичношћу цисплатине и оксалплатине као позитивним контролама. Са друге стране, истим тестом је поређен ефекат горе наведених супстанци на ћелије фибробласта MRC-5, што је омогућило да се креира тзв. индекс селективности комплекса. Анализом ћелиског циклуса је доказано у којој фази новосинтетисани комплекси заустављају ћелиски циклус. Осим тога доказано је да је апоптоза кључни тип смрти малигне ћелије коју изазивају комплекси K1 и K2 и то активирањем унутрашњег, митохондријалног пута активације апоптозе.

У поглављу дискусија анализирани су добијени резултати и поређењу са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су врло детаљно дискутовани, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. Резултати су дискутовани у контексту сличних, различитих, па чак и опречних података о цитотоксичном деловању комплекса платине на ћелијске линије карцинома дојке хуманог и анималног порекла. При томе су наведени ставови из најзначајнијих научних радова поменуте области.

У поглављу литература су прецизно наведене све референце коришћене у припреми и изради докторске дисертације.

На основу претходно изнетих чињеница Комисија сматра да завршена докторска дисертација под називом „Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro*”, кандидата др Ненада В. Марковића, по обиму и квалитету израде одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су да новосинтетисани комплекси платине(II) показују временски и дозно-зависно повећање цитотоксичности на испитиваним туморским ћелијама 4Т1 и MDA-MB-231 уз повећану селективност према туморским ћелијама у односу на малигно нетрансформисане фибробласте MRC-5. Након третмана комплексима платине(II) туморских ћелија 4Т1 и MDA-MB-231, показано је да новосинтетисани комплекси платине(II) смањују вијабилност третираних туморских ћелија индукцијом апоптозе. Поред тога, у третираним туморским ћелијама комплекси платине(II) доводе до застоја у различитим фазама ћелијског циклуса, што може бити

још један од разлога смањења вијабилности третираних туморских ћелија у односу на контролну популацију нетретираних ћелија, јер ћелије које не превазиђу застој у ћелијском циклусу нужно умиру. Врло важан резултат овог истраживања је и што је показано да новосинтетисани комплекси платине(II) у третираним туморским ћелијама повећавају релативни однос Bcl-2/Bax, што последично доводи до активације каспазе-3 и индукције апоптозе и то унутрашњег митохондријалног типа апоптозе.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Из докторске дисертације се закључује да новосинтетисани комплекси платине(II) показују изражен цитотоксични ефекат на ћелијске линије *in vitro*. Овај ефекат је чак израженији у пређењу са стандардним до сада коришћеним препаратима платине који се користе у онкологији. Са друге стране ови комплекси су *in vitro* показали да имају мањи цитотоксични ефекат на малигно нетрансформисане ћелије фибробласта. Ове чињенице представљају добру полазну тачку за испитивање поменутих комплекса у даљим истраживањима са циљем да се укључе у терапију агресивних форми болести какав је троструко негативни (triple negative) тип карцинома дојке.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове докторске дисертације објављени су као оригинално истраживање у међународном часопису индексираним на SCI листи, категорије M23.

1. **Marković N, Zarić M, Živković MD, Rajković S, Jovanović I, Arsenijević N, Čanović P, Ninković S.** Novel Platinum (II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells In Vitro. *ChemistrySelect*. 2019;4(44):12971-7. **M23**

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Ненада В. Марковића **„Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro*”**, на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру тезе засновано на савременим сазнањима и прецизно осмишљеној методологији, и да је адекватно и прецизно спроведено. Добијени резултати су прегледни, јасни, добро продискутовани и дају допринос у решавању актуелне и недовољно проучаване и третиране проблематике.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата др Ненада В. Марковића, урађена под коменторством проф. др Срђана Нинковића ванредног професора Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија и доц. Др Милана Зарића, доцента Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, представља оригинални научни допринос и од великог је и практичног значаја обзиром да недвосмислено показује да новосинтетисани комплекси платине показују цитотоксични ефекат *in vitro* на хумане и анималне ћелијске линије карцинома дојке и могли би бити полазна тачка неких будућих, дубљих испитивања на ову тему.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом **„Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro*”**, кандидата др Ненада В. Марковића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

У Крагујевцу, 13. фебруара 2020. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Доц. др Марија Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, председник;



2. Проф. др Наташа Петронијевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Медицинска и клиничка биохемија, члан;



3. Доц. др Марко Спасић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан


