

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

На III редовној седници Наставно-научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, одржаној 10.12.2021. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед и оцену докторске дисертације мастер физикохемичара Ђорђа Цвјетиновића, под насловом „Синтеза, физикохемијска карактеризација и *in vitro* испитивање липозома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера“. Израда докторске дисертације под наведеним насловом одобрена је одлуком Наставно-научног већа са VII редовне седнице од 16.04.2021. године. На основу те одлуке, Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној 29.04.2021. године дало сагласност да се прихвати предложена тема докторске дисертације. На основу прегледа и анализе докторске дисертације, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Ђорђа Цвјетиновића написана је на 139 страна куцаног текста према Упутству за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду и садржи следеће делове: насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са информацијама о менторима и члановима комисије (1 страна), захвалницу (1 страна), странице са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (4 стране), садржај (3 стране). Текст рада по поглављима је подељен на **Увод** (1 страна), **Теоријски део** (41 страна) који се састоји од следећих глава: Липозоми (3 стране), Синтеза липозома (9 страна), Функционализација липозома (13 страна), Радионуклиди (3 стране), Производња радионуклида за медицинске потребе (5 страна), Примена радионуклида у медицини (1 страна), Примена радионуклида у дијагностици (3 стране), Терапија радиофармацеутицима (2 стране), Радионуклидна тераностика (2 стране), **Експериментални део** (16 страна), **Резултати** (35 страна), **Дискусија** (12 страна), **Закључак** (3 стране) и **Литература** (216 навода, 15 страна). Кандидат је уз текст дисертације приложио Биографију (1 страна) и изјаве прописане од стране Универзитета (4 стране). Дисертација садржи укупно 48 слика и 10 табела, од којих 37 слика и 6 табела приказују истраживања кандидата.

У поглављу **Увод**, описан је предмет и циљ истраживања докторске дисертације. Такође, описана је основна претпоставка односно радна хипотеза на којој је засновано спроведено истраживање.

Теоријски део је подељен на девет целина. У оквиру прве целине, Липозоми, описана је улога и значај липозома као носача лекова, док су у оквиру друге целине, Синтеза липозома, детаљно описани различити поступци припреме липозома. У делу Функционализација липозома дат је детаљан преглед различитих метода функционизације и површинске модификације липозома у циљу добијања липозома

који се могу користити за специфичне улоге у достави лекова са посебним нагласком на терапију канцера. У делу Радионуклиди је дефинисана појава радиоактивности, као и различите врсте радиоактивних распада. У оквиру целине Производња радионуклида за медицинске потребе приказани су различити начини добијања радионуклида који се могу користити у медицини. Примена различитих радиоактивних распада, односно различитих радиоактивних емитера у медицини је описана у целини Примена радионуклида у медицини, док су у деловима Примена радионуклида у дијагностици, Терапија радиофармацеутицима и Радионуклидна тераностика засебно описане специфичне примена одговарајућих радионуклида.

Експериментални део садржи детаљан опис свих експерименталних техника које су коришћене у истраживању и њихов значај. Карактеризација липозома је вршена: динамичким расејавањем светлости, трансмисионом електронском микроскопијом, ИСП-ОЕ спектроскопијом и инфрацрвеном спектроскопијом. Испитивање контролисаног отварања липозома напуњених са магнетним наночестицама Fe_3O_4 је вршено у присуству променљивог магнетног поља спектрофлуориметријским мерењима. Радиообележавање липозома је вршено са радионуклидима ^{99m}Tc , ^{131}I и ^{177}Lu а радиохемијска чистота је испитивана *ITLC* радиохроматографијом. Испитивања *in vitro* стабилности липозома су вршена у различитим биолошким медијима, за различита инкубациона времена и температуре. Такође, извршено је *in vitro* испитивање везивања липозома за различите здраве ћелије (*T3T*) и ћелије канцера (*CT26* и *LS174T*) у присуству или одсуству слободне глукозе. У *in vitro* испитивањима коришћена су спектрофлуориметријска мерења и флуоресцентна микроскопија. На експерименталним животињама (*NOD-SCID* мишеви) са индукованим туморима (*CT26* и *LS174T*) извршена су *in vivo* и *ex vivo* испитивања коришћењем сцинтиграфије и рендгенографије.

Поглавље **Резултати** је подељено у четири целине, Синтеза и карактеризација липозома, Испитивање радиохемијске чистоте, *In vitro* испитивања и Резултати биолошке расподеле. У овим целинама су детаљно приказани резултати добијени у оквиру спроведеног истраживања.

У оквиру поглавља **Дискусија** детаљно су дискутовани и анализирани резултати приказани у поглављу **Резултати**.

У поглављу **Закључак**, сумирани су сви закључци изведени на основу резултата приказаних у овој докторској дисертацији.

У делу **Литература**, наведене су референце према редоследу њиховог навођења у тексту.

Б. Опис резултата дисертације

Циљ ове докторске дисертације је синтеза липозома модификованих глукозом за потенцијалну примену у терапији и дијагностици канцера. За потребе ове докторске дисертације извршена је синтеза липозома модификованих глукозом који су окарактерисани физичкохемијским методама и радиообележени са различитим радионуклидима, испитана је њихова *in vitro* стабилност и *in vivo/ex vivo* биодистрибуција на туморским моделима.

Липозоми су припремљени методом хидратације липидног танког слоја а модификација липозома је вршена помоћу посебно припремљеног деривата *L*. процесом сидрења. Једињење *L*. представља глукозни дериват холестерола који у свом саставу садржи неполарни део ланца, који потиче од холестерола, за који је закачен поларни глукозни остатак. Због саме структуре једињења неполарни део деривата *L*. се лако уграђује у липидни двослој липозома док поларни део односно глукозни остатак остаје на површини и доводи до глукозне модификације. Масени однос липидне основе липозома и деривата *L*. је вариран у циљу добијања оптимизованих липозома који показују најадекватније физичкохемијске особине (утврђене различитим методама карактеризације) за даља биолошка *in vitro* и *in vivo* истраживања. Липозоми модификовани глукозом су у току свих спроведених истраживања упоређени са контролном групом немодификованих липозома. Такође, одређен број синтеза је посвећен додатној модификацији липозома у виду пегилације или додавањем магнетних наночестица Fe_3O_4 у процесу синтезе. Процес пегилације је довео до стварања непожељно великих липозома за даља биолошка испитивања. Међутим, додавање магнетних наночестица у липозоме модификоване глукозом је резултовало добијањем липозома који се могу отворити у присуству променљивог магнетног поља, што је потврђено спектрофлуорометријским мерењима.

Оптимизовани липозоми модификовани глукозом су радиообележени са различитим радионуклидима који се користе у медицини и испитана је њихова радиохемијска чистоћа употребом *ITLC*-радиохроматографије. Радиообележавање липозома је вршено према претходно описаним процедурама или процедурама установљеним у току самог истраживања, варирањем инкубационог времена липозома и радионуклида. Максимално обележавање се постиже након пола сата инкубације. Висока ефикасност обележавања (> 80%) је постигнута за липозомске формулације обележене са ^{99m}Tc и ^{177}Lu . Обележавање липозома са ^{131}I се показало као неефикасно и такви радиообележени липозоми нису коришћени у биолошким испитивањима.

Стабилност радиообележених липозома је *in vitro* испитана у физиолошком раствору и хуманом серуму на собној температури и на 37 °C. *In vitro* стабилност ^{99m}Tc -липозома након 24h износи преко 95 %, а ^{177}Lu -липозома преко 94 % након 72h инкубације. Механизам везивања липозома за различите ћелијске линије (Т3Т, СТ26, LS174Т), испитан је у присуству или одсуству слободне глукозе. Установљено је повећано везивање липозома модификованих глукозом за здраве, а посебно за ћелије канцера посредством глукозних (GLUT) рецептора присутних на површини, при чему долази до конкуренције са слободном глукозом.

Радиообележени липозоми су коришћени у биолошким испитивањима на мишевима са индукованим туморима. Повећано накупљање липозома модификованих глукозом у туморима, у поређењу са контролном групом немодификованих липозома, је утврђено визуелно (сцинтиграфијом) и *ex vivo* квантификацијом биодистрибуције радиообележених липозома у различитим органима и туморима мишева. Резултати добијени у оквиру ове дисертације значајно доприносе даљим испитивањима примене липозома модификованих глукозом у терапији и дијагностици канцера.

В. Упоредна анализа резултата дисертације са подацима из литературе

Због својих специфичних особина, липозоми су предмет великог интересовања и

опсежних истраживања у пољу дијагностике и терапије канцера. Иако су липозоми откривени и детаљно описани пре неколико деценија, њихове повољне физичкохемијске особине, релативно једноставна синтеза, велики избор липида који могу ући у састав липидног двослоја, као и мноштво различитих модификација, и даље чини липозоме веома атрактивним системима за доставу различитих лекова. Велико интересовање и оспежна истраживања која се спроводе на бази липозома су поткрепљена стотинама радова који се објаве годишње, десетинама одобрених лекова као и неколико десетина текућих клиничких студија лекова на бази липозома, док је најмасовнија медицинска употреба липозома остварена управо у периоду 2020-2021. године у виду носача одређених Ковид19 вакцина.

Липозоми као носачи лекова користе се у лечењу различитих обољења, а посебно у терапији и дијагностици канцера [1], што је такође испитивано у оквиру ове дисертације. За разлику од до сада регистрованих и одобрених лекова на бази липозома у терапији канцера [1,2], који се углавном заснивају на пасивној достави лекова посредством тзв. ефекта повећане пропустљивости и задржавања (енг. *enhanced permeability and retention, EPR*) и/или продуженој циркулацији посредством маскирања липозома пегилацијом, липозоми модификовани глукозом и синтетисани у оквиру ове дисертације показују специфично циљање ћелија канцера. Ово специфично циљање се заснива на интензивној пролиферацији ћелија канцера које поседују велики број *GLUT* рецептора на својој површини и представља основни предуслов за стварање активног система доставе лекова.

Липозоми модификовани глукозом синтетисани на начин описан у дисертацији су испитани у *in vitro* условима инкубације са разлитим ћелијама (*T3T*, *CT26* и *LS174T*), у присуству или одсуству слободне глукозе. Резултати указују на повећано везивање модификованих липозома за здраве, а посебно за ћелије канцера, при чему долази до конкуренције са слободном глукозом. Ови подаци недвосмислено указују на везивање липозома модификованих глукозом за *GLUT* рецепторе на површини ћелије.

Иако су у литератури описани липозоми са сличним модификацијама глукозом [3–5] циљ тих истраживања је примарно био усмерен ка терапији тумора на мозгу, односно олакшаном проласку липозома кроз крвно-моздану баријеру. У овој дисертацији је детаљно испитано *in vivo* понашање липозома модификованих глукозом и њихова биодистрибуција у здравим органима и различитим туморима који нису лоцирани у мозгу. Резултати недвосмислено указују на повећано накупљање модификованих липозома у различитим хуманим и мишјим туморима. У овом истраживању су остварени високи удели накупљања липозома у туморима у поређењу са подацима из сличних радиотрасерских истраживања [6] у оквиру којих је испитивана употреба липозома у дијагностици и терапији канцера. Релативно једноставан процес модификације који је коришћен има велику предност у поређењу са сличним модификацијама [7] које су вршене у циљу добијања активног циљања ћелија канцера. Такође, у овом истраживању је коришћена радиотрасерска метода на липозомима модификованим глукозом која омогућава добијање знатно прецизнијих и осетљивијих података биодистрибуције у поређењу са до сада коришћеном флуоресцентном методом обележавања у сличним истраживањима [5], која има знатно мању *ex vivo* осетљивост док у пракси даје ограничене квантитативне *in vivo* податке.

Иако су у литератури до сада описани различити радиообележени липозоми [6,8] у циљу добијања терапијских и/или дијагностичких препарата у терапији канцера у овој дисертацији је развијена и демонстрирана релативно једноставна процедура радиообележавања липозома модификованих глукозом са радионуклидом ^{177}Lu . Комбиновањем постојећих тераностичких својстава радионуклида ^{177}Lu са липозомима модификованим глукозом који специфично циљају ћелије канцера доводи до стварања

вишемодалног тераностичког препарата, који је описан у овој дисертацији и има велики потенцијал у поређењу са сличним тераностичким системима.

До сада су у литератури описани различити начини контролисаног отварања липозома [9,10] у сврху циљане доставе лека. Такође, у овој дисертацији су синтетисани липозоми модификовани глукозом напуњени са магнетним наночестицама Fe_3O_4 и успешно је демонстрирано њихово индуковано отварање у присуству променљивог магнетног поља. Отварање липозома посредством магнетног поља пружа велику практичну предност, услед неинвазивности и могућности усмеравања поља ка одређеном делу тела.

Референце:

- [1] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, Liposomal formulations in clinical use: An updated review, *Pharmaceutics*. 9 (2017) 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- [2] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 267–276. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- [3] F. Xie, N. Yao, Y. Qin, Q. Zhang, H. Chen, M. Yuan, J. Tang, X. Li, W. Fan, Q. Zhang, Y. Wu, L. Hai, Q. He, Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 163–175. <https://doi.org/10.2147/ijn.s23771>.
- [4] Q. Fu, Y. Zhao, Z. Yang, Q. Yue, W. Xiao, Y. Chen, Y. Yang, L. Guo, Y. Wu, Liposomes actively recognizing the glucose transporter GLUT 1 and integrin $\alpha v \beta 3$ for dual-targeting of glioma, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 352 (2019). <https://doi.org/10.1002/ardp.201800219>.
- [5] Y. Qin, W. Fan, H. Chen, N. Yao, W. Tang, J. Tang, W. Yuan, R. Kuai, Z. Zhang, Y. Wu, Q. He, In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes, *J. Drug Target*. 18 (2010) 536–549. <https://doi.org/10.3109/10611861003587235>.
- [6] A.L. Petersen, J.R. Henriksen, T. Binderup, D.R. Elema, P.H. Rasmussen, A.M. Hag, A. Kjær, T.L. Andresen, In vivo evaluation of PEGylated $64Cu$ -liposomes with theranostic and radiotherapeutic potential using micro PET/CT, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 43 (2016) 941–952. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3272-6>.
- [7] M.K. Riaz, M.A. Riaz, X. Zhang, C. Lin, K.H. Wong, X. Chen, G. Zhang, A. Lu, Z. Yang, Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>.
- [8] P. Laverman, O.C. Boerman, Re: Selective in vitro labeling of white blood cells using $99mTc$ -labeled liposomes, *Nucl. Med. Biol.* 29 (2002) 623. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(02\)00320-7](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(02)00320-7).
- [9] C.A. Monnier, D. Burnand, B. Rothen-Rutishauser, M. Lattuada, A. Petri-Fink, Magnetoliposomes: Opportunities and challenges, *Eur. J. Nanomedicine*. 6 (2014) 201–215. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2014-0042>.
- [10] D. Miranda, J.F. Lovell, Mechanisms of light-induced liposome permeabilization, *Bioeng. & Transl. Med.* 1 (2016) 267–276.

Г. Научни радови и саопштења публиковани из резултата дисертације

Из резултата докторске дисертације, кандидата Ђорђа Цвјетиновића, објављена су три рада:

У међународном часопису изузетних вредности (M21a):

1. **Ђ. Цвјетиновић**, Ж. Пријовић, Д. Јанковић, М. Радовић, М. Мирковић, З. Милановић, М. Мојовић, Ђ. Шкаламера, С. Враћеш-Ђурић, *Bioevaluation of glucose-modified liposomes as a potential drug delivery system for cancer treatment using ¹⁷⁷Lu radiotracking*. J Control Release. 2021 Apr 10; 332:301-311. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.03.006.

У врхунском међународном часопису вредности (M21):

2. **Ђ. Цвјетиновић**, Д. Јанковић, З. Милановић, М. Мирковић, Ј. Петровић, Ж. Пријовић, Е. Poghosyan, С. Враћеш-Ђурић, *¹⁷⁷Lu-labeled micro liposomes as a potential radiosynoviorthesis therapeutic agent*. Int J Pharm. 2021 Oct 25; 608:121106. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121106.

У истакнутом међународном часопису вредности (M22):

3. **Ђ. Цвјетиновић**, З. Милановић, М. Мирковић, Ј. Петровић, А. Весковић, А. Поповић-Бијелић, Ж. Пријовић, Д. Јанковић, С. Враћеш-Ђурић, *Magnetically induced controlled release from glucose-modified liposomes loaded with Fe₃O₄ nanoparticles*. J Nanopart Res 23, 252 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05375-2>

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Синтеза, физикохемијска карактеризација и *in vitro/in vivo* испитивање липозома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc, ¹⁷⁷Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера“, мастер физ.хем. Ђорђа Цвјетиновића, констатовано је да подударање текста (*similarity index*) износи 19%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, комисија сматра да је докторска дисертација Ђорђа Цвјетиновића у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Б. Закључак комисије

На основу изложеног може се закључити да резултати кандидата Ђорђа Цвјетиновића представљају оригиналан и значајан научни допринос у областима физичка хемија – радиохемија и физичка хемија – биофизичка хемија. Из резултата дисертације кандидата проистекла су три научна рада, по један рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a), у врхунском међународном часопису (M21) и у истакнутом међународном часопису (M22). У складу са наведеним, Комисија сматра да кандидат испуњава услове за прихватање завршене докторске дисертације прописане од стране Универзитета у Београду и услове дефинисане Правилником о изради и оцени докторске дисертације на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду. На основу изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду да рад Ђорђа Цвјетиновића под насловом „Синтеза, физичкохемијска карактеризација и *in vitro/in vivo* испитивање липозома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера“ прихвати као дисертацију за стицање научног степена доктора физичкохемијских наука и одобри његову јавну одбрану.

У Београду, 15.12.2021. године.

Комисија:

1. др Ана Поповић Бијелић, ванредни професор

Универзитет у Београду - Факултет за физичку хемију

2. др Марко Даковић, ванредни професор

Универзитет у Београду - Факултет за физичку хемију

3. др Зорана Милановић, научни сарадник

Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке-Винча
