

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
ДОКТОРАНДА ДАНИЦЕ ЈОВИЋ, МАСТЕР

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију 07.12.2017., Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <ol style="list-style-type: none"> др Ђенђи Ваштаг, редовни професор, Аналитичка хемија (01.10.2014.), Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председник Комисије др Александар Ђорђевић, редовни професор, Општа хемија (01.10.2009.), Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, ментор др Милан Вранеш, ванредни професор, Аналитичка хемија (24.12.2017.), Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, члан др Владимир Срдић, редовни професор, Неорганске технологије и материјали (19.10.2006.), Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, члан др Јасминка Мрђановић, научни сарадник, Природно-математичке науке-Биологија, генотоксикологија (12.06.2013.), Институт за Онкологију у Сремској Каменици, члан др Никола Кнежевић, виши научни сарадник, Природно-математичке науке-Хемија (24.05.2017.), Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, члан
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Даница, Стојадин, Јовић (рођена Радмановац)</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 25.12.1986., Вршац, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <ul style="list-style-type: none"> Природно-математички факултет, УНС, Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Дипломирани хемичар-биохемија Природно-математички факултет, УНС, Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Биохемија, Мастер биохемичар <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2010, Природно-математички факултет, УНС, Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Докторске академске студије хемије</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /</p>

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У докторској дисертацији је представљена синтеза и карактеризација новог фулеренол/доксорубин наноконструкта, синтетисаног са циљем добијања потенцијалне нове наноформулације постојећег антинеопластичког доксорубина, која би показала већу биолошку активност уз смањење нежељених ефеката које сам лек изазива-кардиотоксичности.

Наноконструкт фулеренол/доксорубин је окарактерисан бројним методама пратећи два основна експериментална приступа: молекулско-спектроскопске методе (XPS, денситометрија и транспортне особине, NMR, MS, Раманска и UV спектроскопија, SFM) и методе наноконструкције (DLS, AFM, TEM), као и рачунарске симулације (RDF).

Биолошка испитивања су изведена на пет ћелијских линија, од тога четири малигно трансформисаних континуалних хуманих ћелијских линија (MCF-7, MDA MB-231, HS-294 T, U-251) и једној здравој континуалној ћелијској линији (MRC-5) применом сулфородамин В (SRB) теста цитотоксичности, као и на моделу зебрица (*Danio rerio*) испитивањем леталности, морфолошких абнормалности и срчане функције третираних ембриона зебра риба.

Резултати биолошких испитивања на *in vitro* моделу различитих туморских ћелијских линија показују значајан антипролиферативни ефекат наноконструкта, као и селективност према туморским у односу на здраву ћелијску линију.

У *in vivo* истраживању на моделу ембриони зебрица третирани наноконструктом су имали значајно већу стопу преживљавања и мање ометање кардиоваскуларних функција него ембриони третирани истим концентрацијама самог доксорубина, што указује да је укупна токсичност наноконструкта у поређењу са доксорубином мања.

Дисертација је написана на српском језику уз сажетак на српском и енглеском језику и садржи: 7 поглавља, 222 страница, 16 табела, 82 слике (од тога 56 графика) и 24 прилога. У дисертацији је цитирано 375 литературних навода. Поред тога, приложена је и Биографија кандидата са библиографијом, као и кључна документацијска информација на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У уводном делу ове докторске дисертације (2 стране) су пратећи литературне податке обрађени основни појмови везани за нанотехнологију и наноматеријале, са посебним освртом на њихову примену као наносача антинеопластичког.

У теоријском делу (58 страна) је истакнут значај интеракција наноматеријала са ћелијама уз преглед најбитнијих особина наночестица које утичу на преузимање од ћелија и трендова у наноформулацији лекова и нанотерапији уз преглед најбитнијих особина наноформулација антинеопластичког.

Као потенцијални наносач истакнут је фулеренол и обрађен детаљно кроз различите путеве синтезе и физичко-хемијске особине водених раствора фулеренола. Посебна пажња је посвећена навођењу биолошке активности фулеренола, уз литературне наводе по питању антиоксидативне активности, радио-, неуро- и органопротективног ефекта, антипролиферативне активности. Такође, дат је преглед литературе по питању токсичности, фармакокинетице и биокомпатибилности фулеренола.

Од антинеопластичких лекова детаљно је описан доксорубин, фармакокинетика лека, механизми дејства како лека, тако и наноформулација лека уз назначена нежељена дејства и токсичност. Дат је текстуално-табеларни преглед најзначајнијих наноформулација доксорубина заснованих на различитим наносистемима са истакнутим особинама и недостатацима.

У одељку циљеви истраживања (1 страна) су јасно и концизно постављена 4 основна циља истраживања ове докторске дисертације:

1. синтеза стабилног нанокompозита комерцијалног антинеопластика доксорубицина са наноносачем фулеренолом
2. физичко-хемијска карактеризација и испитивање стабилности новог нанокompозита фулеренол/доксорубицин
3. упоређивање цитотоксичне активности комерцијалног антинеопластика доксорубицина и новог нанокompозита фулеренол/доксорубицин *in vitro* на 4 малигне хумане ћелијске линије и једној здравој хуманој ћелијској линији
4. испитивање ефекта фулеренола, доксорубицина и нанокompозита фулеренол/доксорубицин на *in vivo* моделу зебрица

У делу материјал и методе (23 стране) је детаљно представљен синтетски пут фулеренола коришћеног за потребе извођења експерименталног дела докторске дисертације, као и припрема раствора нанокompозита фулеренол/доксорубицин. За све методе су дати детаљни описи поступака припреме узорака и извођења експеримената, и посебна пажња је поклоњена савременим научним методама. Рачунарске поставке су јасно и у потпуности дефинисане и описане, као и поступци биолошких тестова, припреме биолошких узорака, њихова обрада и начини извођења експеримената и обрада резултата.

У делу резултати (50 страна) су окарактерисани фулеренол као молекул и наночестица, као и нанокompозит пратећи два различита приступа: молекулско-спектралне методе (XPS, Raman, FTIR, MS, NMR, UV, SFM) и методе нанокарактеризације (AFM, TEM, DLS). Ово поглавље је подељено у добро организоване, смислене, логичке целине са резултатима сваке од наведених метода представљених у виду табела (дензитометрија и транспортне особине, XPS, резултати *in vitro* и *in vivo* огледа, DLS), слика (AFM, TEM, резултати *in vivo* огледа), графичких приказа (дензитометрија и транспортне особине, DLS, резултати *in vitro* и *in vivo* огледа), и спектра (XPS, UPLC, NMR, Raman, FTIR, UV, SFM). Резултати су представљени са недвосмисленим и јасним описима и упоређивањем са одговарајућом савременим литературним наводима.

Дискусија (34 страна) ове докторске дисертације је подељена по логичким и следственим целинама и представља богато и добро структурирано образложење добијених експерименталних и теоријских резултата са савременим и добро одабраним избором научне литературе. Сваки поднаслов је детаљно и јасно обрађен уз јасно истицање и дискусију добијених резултата.

На крају, у закључку (5 стране) су јасно и прегледно, логички и концизно сумирани резултати ове докторске дисертације који недвосмислено указују на научни допринос резултата истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом, посебно са аспекта оригиналности и актуелности теме истраживања, са назначеном значајном потенцијалном применом у клиничкој пракси.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

1. **Danica S. Jović**, Mariana N. Seke, Aleksandar N. Djordjevic, Jasminka Ž. Mrđanović, Lidija D. Aleksić, Gordana M. Bogdanović, Aleksandar B. Pavić, Janez Plavec, Fullereneol nanoparticles as a new delivery system for doxorubicin, *RSC Advances* 6 (2016) 38563–38578, M21
2. Vraneš Milan, Borišev Ivana, Tot Aleksandar, Armačović Stevan, Armačović Sanja, **Jović Danica**, Gadžurić Slobodan, Djordjevic Aleksandar, Self-assembling, reactivity and molecular dynamics of fullereneol nanoparticles, *Physical chemistry chemical physics* 19 (2017) 135-144, M21
3. Seke Mariana, Petrovic Danijela, Djordjevic Aleksandar, **Jović Danica**, Labudovic-Borovic Milica, Kanacki Zdenko, Jankovic Milan, Fullereneol/doxorubicin nanocomposite mitigates acute oxidative stress and modulates apoptosis in myocardial tissue, *Nanotechnology* 27 (2016) 485101, M21

VII ZAKЉUČICI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Реализацијом ове докторске дисертације остварени су постављени циљеви представљени у пријави, на првом месту синтеза новог стабилног нанокompозита фулеренол/доксорубицин који показује значајну биолошку активност у смислу цитотоксичности према малигним континуалним ћелијским линијама уз доказано смањење кардиотоксичности на моделу зебрица, што је иначе ограничавајући фактор при клиничкој примени доксорубицина.

У експерименталном делу је испитана организација воде и интермолекулска интеракција између воде и фулеренола кроз процес стварања наноагломерата на различитим температурама примењујући експериментални и рачунски приступ. Наночестице фулеренола су примарно окарактерисане применом динамичког расејања светлости, атомске микроскопије сила и трансмисионе електронске микроскопије. Густина, електрична проводљивост и динамичка вискозност водених раствора фулеренола су мерене у температурном опсегу 293,15-315,15 К. Из резултата експериментално одређене густине добијени су важни термодинамички параметри, као што је привидна моларна запремина, а израчунате су и парцијалне моларне запремине воде и фулеренола. У циљу бољег разумевања природе интеракција фулеренола и воде, примењена је DFT симулација и функција радијалне дистрибуције.

Резултати указују на организацију наночестица фулеренола у води, што је веома битно узимајући у обзир њихову примену као наноносача у биолошким медијумима и системима које одликује висок садржај воде. Нековалентна природа интеракција доксорубицина и фулеренолских наночестица у нанокompозиту је потврђена хроматографски, NMR-ом, масеном спектралном анализом, као и применом спектроскопских метода: Raman и UV спектроскопијом, као и спектрофотометријом. Поред тога, резултати указују и на могућност постојања димера самог лека доксорубицина, који и као такав, али и као појединачни молекул улази у састав нанокompозита. Карактеризација честица нанокompозита је испитана микроскопијом атомских сила, динамичким расејањем светлости и трансмисионом електронском микроскопијом.

Циљ биолошког истраживања описаног у овом раду је био испитивање особина нанокompозита фулеренол/доксорубицин, потенцијалног цитотоксичног ефекта на хумане континуалне малигне ћелијске линије, као и токсичност према ембрионима зебрица. Доксорубицин и нанокompозит су у испитаним концентрацијама ($0,001-10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, рачунато на доксорубицин) показали значајну активност у погледу инхибиције ћелијског раста. Уочено је да доксорубицин испољава највећи цитотоксични ефекат на HS-294 T ($EC_{50}=0,0532 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) у 72-h третману, затим на HS-294 T ($EC_{50}=0,18 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) у 48-h третману и према MCF-7 ($EC_{50}=4,0372 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) у 24-h третману. Уколико се пореди сензитивност ћелијских линија по појединачним дужинама третмана, нанокompозит испољава највећи цитотоксични ефекат на HS-294 T ($EC_{50}=0,0438 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) у 72-h третману, затим на U-251 ($EC_{50}=0,16 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) у 48-h третману и према MCF-7 ($EC_{50}=2,22 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) у 24-h третману. Применом серије различитих концентрација добијен је временски- и концентрационо-зависан ефекат. Упоредном анализом ефективних концентрација 50 (EC_{50}) вредности за нанокompозит и доксорубицин закључује се да је антитуморска активност нанокompозита већа у поређењу са ефектом самог лека на свим ћелијским линијама при свим дужинама третмана, осим 24-часовног третмана на HS-294 T, 48-часовног третмана на HS-294 T, и 72- часовног третмана на U-251. Однос NT/T (количник вредности EC_{50} нетуморских и EC_{50} вредности туморских ћелија) указује на то да и у случају примене лека и нанокompозита постоји селективна антипролиферативна активност према свим туморским ћелијама у поређењу са нетуморском ћелијском линијом (однос NT/T већи од 1), осим у случају 24-часовног третмана на HS-294 T и 48-часовног третмана на MDA-MB-231. На основу резултата се закључује да нанокompозит може бити обећавајући унутарћелијски носач за ефикасну доставу антинеопластичног лека доксорубицина у туморске ћелије и да се цитотоксичност истог може поредити са цитотоксичношћу комерцијалног доксорубицина.

Резултати ембриотоксичности код зебра риба указују на смањење свеукупне токсичности, посебно кардиотоксичних ефеката, те повећања безбедности нанокompозита у поређењу са комерцијалним доксорубицином. Ембриони зебрица третирани нанокompозитом су имали значајно већу стопу преживљавања и мање ометање кардиоваскуларних функција него ембриони третирани истим концентрацијама самог доксорубицина, што указује да је укупна токсичност нанокompозита у поређењу са доксорубицином мања.

Наноконтрозит фулеренол/доксорбуцин је окарактерисан бројним физичко-хемијским методама. Рачунарске симулације, микроскопски и спектроскопски подаци, као и резултати биолошких испитивања указују на то да нековалентне интеракције између фулеренолских наночестица и доксорубицина могу бити кључни корак у стварању синергистичког наносистема за доставу антинепластичног лека доксорубицина у биолошким системима.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидат мастер Даница Јовић је спровела истраживања у складу са планом датим у пријави теме докторске дисертације. Веома је студиозно и поступно приступила обради и анализи великог броја експерименталних података добијених бројним експерименталним приступима и биолошким истраживањима, који су успешно систематизовани у добро осмишљене целине целине. Текст ове докторске дисертације на јасан и разумљив начин описује тему истраживања и приказује резултате рада са свим неопходним техничким и теоријским детаљима. Резултати истраживања су презентовани систематично, свеобухватно и јасно у виду слика, табела и дискусије. Успешно су примењене савремене методе физичко-хемијске карактеризације. Кроз приказ и интерпретацију резултата биолошких испитивања, кандидат је показала добро познавање ове материје и способност за интердисциплинарни рад, повезивање и истицање важних резултата актуелне и комплексне проблематике са значајним потенцијалом примене.

Комисија једногласно позитивно оцењује начин приказа резултата, дискусију и тумачење резултата, као и извођење закључака који дају јасне одговоре на постављене циљеве.

IX	КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
1.	Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме Да, Комисија оцењује да је докторска дисертација урађена и написана у потпуности у складу са образложењима наведеним у пријави теме.
2.	Да ли дисертација садржи све битне елементе Да, дисертација садржи све битне елементе-дефинисање теме истраживања, преглед постојећих актуелних истраживања, јасан, детаљан и прегледан приказ експерименталних резултата и њихову дискусију, списак литературе и закључак.
3.	По чему је дисертација оригиналан допринос науци Комисија сматра да ова докторска дисертација има све битне елементе оригиналног научног рада, чији се оригиналан научни допринос науци огледа како у фундаменталном, тако и у ширем апликативном значају, где се као посебан научни допринос ове дисертације издваја добијање новог биолошки активног нанокомпозита фулеренол/доксорубицин уз значајно смањено кардиотоксично дејство у поређењу са комерцијалним леком доксорубицином. Детаљном анализом извештаја тестирања на плагијаризам применом софтвера iThenticate (https://www.ithenticate.com/), Комисија закључује да је ова докторска дисертација оригинално дело и да не представља плагијат.
4.	Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Комисија је мишљења да ова докторска дисертација не садржи недостатке.
X	ПРЕДЛОГ:
	На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже да се докторска дисертација под називом: „Синтеза, карактеризација и биолошка испитивања фулеренол/доксорубицин нанокомпозита” прихвати, а кандидату одобри одбрана.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Ђенђи Ваштаг, редовни професор, председник комисије

др Александар Ђорђевић, редовни професор, ментор

др Милан Вранеш, ванредни професор, члан

др Владимир Срдих, редовни професор, члан

др Никола Кнежевић, виши научни сарадник, члан

др Јасминка Мрђановић, научни сарадник, члан