

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.12.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Бранке Вуковић-Гачић о урађеној докторској дисертацији Вере С. Симић, студента докторских студија на Катедри за микробиологију Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом **„Антимикробна, цитотоксична и генотоксична активност новосинтетисаних комплекса паладијума(II) и платине(II) са 2-(дифенилфосфино)бензалдехид-1-адамантоилхидразоном”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Бранка Вуковић-Гачић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Илија Брчески, ванредни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду и др Стоимир Коларевић, научни сарадник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Вере Симић, под насловом **„Антимикробна, цитотоксична и генотоксична активност новосинтетисаних комплекса паладијума(II) и платине(II) са 2-(дифенилфосфино)бензалдехид-1-адамантоилхидразоном”**, састоји се из 154 стране и садржи 8 поглавља: Увод (36 стране), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (35 стране), Резултати (39 страна), Дискусија (11 стране), Закључци (2 стране), Литература (23 страна) и Прилог (7 стране). На почетку дисертације приложен је апстракт на српском и енглеском језику. Дисертација садржи 20 табела и 60 слика. Поглавље литература садржи 206 библиографских јединица. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња Вера Симић у оквиру шеснаест подпоглавља обрадила је општа и савремена сазнања везана за ужу научну област која је била предмет истраживања. У уводном делу тезе изнет је детаљан приказ глобалног морталитета у људској популацији који је последица инфективних болести и канцера. Описани су основни принципи хемиотерапије и представљене су различите групе антимикробних и антиканцерских хемотерапеутика који се примењују у клиничкој пракси, на основу њихових механизма дејства. Представљени су *in vitro* тестови који се користе у савременим истраживањима активности антимикробних и антоканцерских агенаса. Описани су проблеми који се јављају у развоју и примени хемиотерапеутика, који се пре свега односе на изузетну токсичност за здрава ткива услед неспецифичног дејства, појаву резистенције, и генотоксично и мутагено дејство. Представљен је и значај испитивања

генотоксичности у раним фазама развоја нових лекова и могућност усмеравања даљих истраживања на хемијске модификације испитиваних једињења, уколико се покаже да би њихова примена носила ризике по здравље пацијената или њиховог потомства.

Истакнуто је да је изучавање координационих једињења са прелазним металима од посебног значаја за развој нових антимикробних и антиканцерских хемиотерапеутика који би били ефикаснији и мање токсични у односу на постојеће. Указано је на значај избора и улогу лиганда у хемијским и биолошким својствима координационих комплекса. Описана је група ацилхидразонских лиганда, деривата 2-(дифенилфосфино)бензалдехида и њихових комплекса паладијума(II) и платине(II), за које су истраживања у последњој деценији показала значајни антиканцерски и антимикробни потенцијал. Описана је и структура новосинтетисаног ацилхидразонског лиганда 2-(дифенилфосфино)бензалдехид-1-адамантоилхидразона и његових комплекса паладијума(II) и платине(II). Такође, представљена су једињења адамантана која се користе у медицини у третманима вирусних инфекција и потенцијали за побољшање биолошке активности једињења са већ познатим фармаколошким профилем, инкорпорацијом адамантил групе.

Полазећи од ових основа, кандидаткиња је поставила **ЦИЉЕВЕ** истраживања биолошких *in vitro* активности новосинтетисаних једињења – лиганда и његових комплекса паладијума(II) и платине(II), који укључују следеће: испитивање антимикробне активности на одабраним сојевима бактерија и гљивица које обухвата референтне сојеве и атенуисани сој *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin*, BCG; испитивање цитотоксичне активности и потенцијалног селективног дејства на континуираним ћелијским линијама које воде порекло од здравих (MRC-5) и канцерских ткива (Нер-2 и A549); упоређивање цитотоксичне активности ових једињења са активношћу познатих цитостатика цисплатине, карбоплатине и оксалиплатине; испитивање утицаја на пролиферацију и време дуплирања популације ћелија; испитивање ћелијске смрти третираних малиглих ћелија A549; испитивање утицаја на директну миграцију ћелија; испитивање генотоксичног дејства путем детекције оштећења молекула ДНК на ћелијским линијама MRC-5, Нер-2 и A549; испитивање антивирусне активности према полиовирусу тип 1, на високоосетљивој Нер-2 ћелијској линији и упоређивање са активношћу интерферона α -2a.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у два подпоглавља у којима су описане експерименталне процедуре свих метода коришћених приликом израде ове докторске дисертације, као и порекло свих супстанци и материјала. У подпоглављу Методе описана је припрема раствора лиганда, комплекса паладијума(II) и платине(II) и тестирање стерилности методом мембранске филтрације, најсавременијом техником која подразумева рад у асептичној, херметички изолованој комори. Описане су методе култивације и чувања сојева бактерија и гљивица, као и идентификација класичним микробиолошким техникама бојења и применом високоосетљивог аутоматизованог система VITEK 2 за детекцију биохемијских карактеристика микроорганизама. За испитивање антимикробне активности примењена је микротитрациона метода, а за детекцију раста микроорганизама коришћен је реагенс са ресазурином, који је посебно олакшао испитивања на спорорастућој бактерији *M. bovis Bacillus Calmette-Guérin*. Описане су технике оживљавања и одржавања ћелијских култура и њихова контрола квалитета пре употребе у експериментима. Цитотоксична активност лиганда, комплекса паладијума(II) и платине(II) испитана је у ресазурин микрототрационом UptiBlue тесту, на MRC-5 (фибробласти здравог ткива плућа фетуса), A549 (аденокарцином плућа) и Нер-2 (карцином епитела ларинкса) ћелијским линијама. Представљен је и начин одређивања

селективности испитиваних једињења према канцерским ћелијским линијама. Краткотрајна шестодневна пролиферација праћена је методом селективног бојења трипан плавим. За морфолошку анализу ћелијске смрти (апоптоза и/или некроза) коју индукује испитивана супстанца лиганд у А549 ћелијама примењена је светлосна микроскопија са фазним контрастом и флуоресцентна микроскопија, након диференцијалног бојења ћелија раствором акридин оранж / етидијум бромид. *Scratch* или *Wound-healing* тестом испитиван је утицај супстанци на директну миграцију циљних ћелија, а за испитивање генотоксичности употребљена је алкална верзија комет теста. Детаљно је описан поступак припреме вирусне суспензије полиовируса тип 1 за тест антивирусне активности, неутрализацијом интернационалног референтног стандарда са три типа полиовируса, а титар вирусне суспензије одређен је методом праћења цитопатогеног ефекта и применом Керберове формуле. Антивирусна активност испитана је праћењем редукције цитопатогеног ефекта на високоосетљивој ћелијској линији Нер-2, а за квантификацију антивирусног ефекта коришћен је UptiBlue тест. У статистичкој обради података кандидаткиња је користила параметријске и непараметријске статистичке анализе (Student t-test, Mann Whitney U-test) помоћу софтверског алата Excel (Microsoft Office 2007, САД), и програма Statistica 6.0 (StatSoft, UK) и CombiStats (EDQM).

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, кандидаткиња је добијене резултате приказала у седам целина. У првом подпоглављу су приказани резултати антимикуробне активности у које је укључено бактериостатичко и бактерицидно/фунгицидно дејство испитиваних једињења, на основу антимикуробних параметара MIC и MBC/MFC. Добијени резултати су показали снажно бактериостатичко и бактерицидно дејство лиганда према атенуисаном соју *M. bovis Bacillus Calmette-Guérin* и умерено или слабо дејство лиганда, комплекса паладијума(II) и платине(II) према појединим референтним сојевима бактерија, у поређењу са познатим антимикуробним лековима. У другом одељку су приказани резултати добијени у тесту цитотоксичности, према свакој од коришћених ћелијских линија, а представљени су и резултати провере селективности једињења према малигним ћелијским линијама. Показано је да ова једињења имају дозно-зависан ефекат на поједине испитиване ћелијске линије. Истакнуто је да су најосетљивије Нер-2 ћелије пореклом из канцера ларинкса, док су највећу резистенцију показале А549 ћелије пореклом из аденокарцинома плућа. Здраве ћелије плућа MRC-5 показале су висок степен отпорности на новосинтетисана једињења. Високо-селективно дејство новосинтетисаних једињења детектовано је према малигним ћелијама Нер-2, а остварена је активност лиганда према ћелијама А549. Добијене су цитотоксичне активности у опсегу активности референтних цитостатика карбоплатине и оксалиплатине. У трећем одељку представљени су ефекти ниских концентрација једињења на пролиферацију и време дуплирања популације ћелија. Резултати ових истраживања показали су значајне инхибиције пролиферације ћелија испитиваним једињењима, а добијени ефекти су слабији од ефеката референтних цитостатика цисплатине, карбоплатине и оксалиплатине. Такође су добијени значајни ефекти на време дуплирања популације ћелија који показују цитостатску активност ниских концентрација испитиваних једињења на ћелијама Нер-2 и MRC-5. У следећем поглављу представљени су резултати испитивања ћелијске смрти, морфолошким анализом и испитивањем интегритета ћелијске и нуклеусне мембране. Показано је да лиганд индукује апоптозу у циљним ћелијама А549, а резултати су представљени у виду репрезентативних фотомикрографија, на којима су обележене типичне морфолошке карактеристике ране и касне апоптозе. Следеће подпоглавље садржи приказ резултата *Wound healing* теста, односно резултате ефекта испитиваних једињења на директну миграцију циљних ћелија. Приметно је да испитивана једињења показује значајан утицај на смањење потенцијала директне миграције ћелија, који је рангу или нешто слабији од

цисплатине. Најбоље инхибиторно дејство на директну миграцију малигних ћелија показао је комплекс платине(II). У шестом подпоглављу приказани су резултати комет теста и генотоксичног ефекта испитиваних једињења на циљне ћелије. Ова истраживања су показала генотоксично дејство комплекса паладијума(II) на здраве ћелије плућа MRC-5 и лиганда на канцерске ћелије Нер-2, слабије од цисплатине. У седмом подпоглављу представљени су резултати испитивања антивирусне активности у третманима пре и после инфекције Нер-2 ћелија полиовирусом тип 1. Резултати у третману пре инфекције, који говоре о антивирусном ефекту на адсорбцију вируса, показали су већи ефекат лиганда од комплекса платине(II), док су резултати у третману после инфекције, који говоре о ефекату на касније фазе вирусног инфективног циклуса и репликацију вируса, указали на већи антивирусни потенцијал комплекса платине(II). Добијени су мањи антивирусни ефекти од интерферона α -2а и остварен је слаб антивирусни потенцијал према полиовирусу тип 1.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** представљена је анализа и интерпретација резултата добијених овим истраживањем. Добијене резултате кандидаткиња повезује у одговарајуће целине и проналази њихов значај у оквиру испитиване проблематике. У овом поглављу кандидаткиња компетентно дискутује добијене резултате, с освртом на савремене литературне податаке, упоређујући резултате са истраживањима на једињењима од клиничког значаја и биолошки активним дериватима 2-(дифенилфосфино)бензалдехида. Кандидаткиња је дискусију груписала у 4 подпоглавља. У првом подпоглављу дискутована је антимикуробна активност супстанци и указано на значај активности лиганда према атенуисаној бактерији *M. bovis* у развоју супстанци које се добро транспортују кроз непремаабилни ћелијски зид микобактерија. Антимикуробна активност на референтним бактеријама и активност других деривата 2-(дифенилфосфино)бензалдехида указују да постоји основа за даље испитивање комплекса паладијума(II) на клиничким изолатима. У другом подпоглављу дискутован је антиканцерски потенцијал супстанци преко цитотоксичности, утицаја на пролиферацију, индукције ћелијске смрти апоптозе и утицаја на директну миграцију циљних ћелија. Посебна пажња посвећена је оствареној високо-селективној цитотоксичној активности супстанци према малигној ћелијској линији Нер-2 и дискутован је њихов значај за даљи развој потенцијалног хемиотерапеутика у претклиничким и клиничким испитивањима. Наглашено је да слаба цитотоксичност лиганда на здравим ћелијама плућа, уз селективно дејство на испитаној врсти микобактерије усмерава на испитивања овог једињења *in vivo*. У трећем подпоглављу кандидаткиња се бави проблемом детектоване генотоксичности лиганда и комплекса паладијума(II) и могућим ризицима у примени тестираних супстанци. У четвртном поглављу дискутован је антивирусни потенцијал супстанци према препорукама ФДА за развој антивирусних лекова.

Добијени резултати ове докторске дисертације пружају нова сазнања о интензитету антимикуробне и цитотоксичне активности деривата 2-(дифенилфосфино)бензалдехида и први пут у нашим лабораторијама представљају истраживања антимикуробне, антиметастатске, генотоксичне и антивирусне активности у оквиру ове групе једињења.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња сумира добијене резултате и износи преглед најзначајнијих закључака изведених из резултата истраживања биолошке активности лиганда 2-(дифенилфосфино)бензалдехид-1-адамантилхидразона и његових комплекса паладијума(II) и платине(II). Закључује се да испитане супстанце показују антимикуробно дејство према различитим бактеријама, а посебно се истиче снажно антибактеријско дејство лиганда према атенуисаном *M. bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* соју. Такође је закључено да тестиране супстанце остварују инхибицију преживљавања,

пролиферације и миграторног потенцијала малигних ћелија. Закључује се да су ова једињења слабије генотоксична у поређењу са цисплатином и да поседују слаб антивирусни потенцијал.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 206 библиографских јединица. Увид у цитирану литературу показује да је кандидаткиња, студиозно приступила истраживању и избором релевантне литературе успешно испунила задате циљеве. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У поглављу **ПРИЛОГ** дате су репрезентативне криве раста ћелија добијене експериментима краткотрајне шестодневне пролиферације.

Радови и конгресна саопштења који чине део докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M22** Đorđević, M.M., Jeremić, D.A., Rodić, M.V., **Simić, V.S.**, Brčeski, I. D., Leovac, V.M. (2014). Synthesis, structure and biological activities of Pd(II) and Pt(II) complexes with 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone. *Polyhedron* 68, 234-240.
2. **M23** **Simić, V.**, Kolarević, S., Brčeski, I., Jeremić, D., Vuković-Gačić, B. (2016). Cytotoxicity and antiviral activity of palladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone. *Turk. J. Biol.* 40, doi:10.3906/biy-1503-23. *In Press*.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34** **Simić, V.**, Kolarević, S., Brčeski, I., Jeremić, D., Čebedžić, R., Vuković-Gačić, B. (2015). Antimikrobna aktivnost kompleksa paladijuma(II) i platine(II) sa 2-(difenilfosfino)benzalhid 1-adamantoil hidrazonom, X kongres mikrobiologa Srbije, Mikromed 2015, Beograd, Srbija, Abstracts 226.
2. **M34** **Simić, V.**, Kolarević, S., Brčeski, I., Jeremić, D., Vuković-Gačić, B. (2015). Antivirusna aktivnost kompleksa paladijuma(II) i platine(II) sa 2-(difenilfosfino)benzalhid 1-adamantoil hidrazonom, X kongres mikrobiologa Srbije, Mikromed 2015, Beograd, Srbija, Abstracts 224.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Вере Симић, под насловом „Антимикробна, цитотоксична и генотоксична активност новосинтетисаних комплекса паладијума(II) и платине(II) са 2-(дифенилфосфино)бензалдехид-1-адамантилхидразоном” представља свестрано и савремено урађену студију из области микробиологије, експерименталне онкологије и генотоксикологије. Докторска теза написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе. По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на актуелну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Кандидат је на примерен начин представио истраживачку област у којој је радио и резултате до којих је дошао.

Комисија сматра да докторска дисертација Вере Симић по свом приступу и интерпретираним резултатима представља значајан допринос развоју нових деривата 2-(дифенилфосфино)бензалдехида као потенцијалних хемиотерапеутика.

Комисија са посебним задовољством истиче да је кандидаткиња до сада, из резултата који представљају део докторске дисертације, публиковала 2 рада у међународним часописима од чега један у категорији M22, и један у категорији M23 и да је у једној публикацији први аутор. У припреми је још један научни рад из области докторске дисертације. Такође, кандидаткиња је учествовала са 2 саопштења на научним скуповима. Вера Симић је у току израде докторске дисертације добро оспособљена за самосталан научни рад.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

Београд, 08.02. 2016.

Комисија:

др Бранка Вуковић-Гачић, ментор, редовни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Илија Брчески, ванредни професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Стоимир Коларевић, научни сарадник,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду