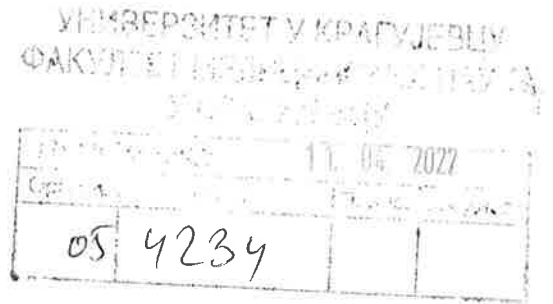


**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**



**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 04.02.2022. године, одлуком бр. IV-03-57/19 формирана је Комисија за одбрану завршне докторске дисертације кандидата Маје Савић под називом:  
**„Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“**, у саставу:

1. **проф. др Биљана Љујић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Генетика, председник;
2. **доц. др Петар Чановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;
3. **проф. др Тибор Ј. Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата Маје Савић 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 Маје Савић под називом „Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“ урађена под менторством проф. др Слободана Новокмета, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, представља оригиналну студију која се бавила испитивањем цитотоксичних ефеката рутенијум(II) терпирдинских комплекса, ( $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl]$  – Ru-1 и  $[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl]$  – Ru-2), коришћењем ћелијских линија хуманих карцинома колона (HCT116 и SW480), ћелија карцинома колона изолованих из BALB/c мишева (CT26), мезенхималних матичних ћелија изолованих из костне срже C57Bl/6 мишева, као и испитивањем антитуморских и евентуалних токсичних ефеката испитиваних комплекса на мишијем моделу карцинома колона индукованог код BALB/c мишева.

Комплекси платине, цисплатина и њени аналози - карбоплатина и оксалиплатина сврставају се у најчешће коришћене антитуморске металофармацеутике. Поред клиничког успеха који поседују, наведени лекови имају и одређена ограничења, а то су системска токсичност (нефротоксичност, хепатотоксичност, неуротоксичност, мијелотоксичност и гастроинтестинална токсичност) и учесталост резистенције на њихову примену. Ова ограничења су покренула истраживања за другим комплексима прелазних метала сличне антитуморске активности али прихватљивијег профила

токсичности. Комплекси рутенијума су препознати као ефикасна алтернатива комплекса платине, које карактеришу различити механизми дејства, као и потенцијал за превазилажење резистенције на лекове на бази платине и за сада су једини неплатински комплекси који су ушли у фазу клиничког тестирања као хемиотерапеутици. Потврђена *in vitro* и *in vivo* активност комплекса рутенијума је резултат њихове способности да истовремено интерагују са више циљних мета, укључујући ометање репликације и транскрипције ДНК и следствену апоптозу, заустављање ћелијског циклуса, деловања на теломере, интеракцију са протеинима и инхибирање ензима.

Испитивани рутенијум(II) терпиридински комплекси, Ru-1 и Ru-2, поседују раније потврђену цитотоксичност према мишјој и хуманој ћелијској линији карцинома колона (СТ26 и НСТ116), хуманој ћелијској линији карцинома плућа (А549), хуманој ћелијској линији карцинома грлића материце (HeLa) и умерену цитотоксичност према здравим ћелијама, односно, хуманим фибробластима плућа (MRC-5) *in vitro*, међутим њихова антитуморска активност и токсичност *in vivo* до сада нису испитивани.

Резултати ове докторске дисертације су показали да испитивани рутенијум(II) терпиридински комплекси делују цитотоксично на ћелијске линије хуманог и мишјег карцинома колона (НСТ116, SW480, СТ26), као и на мишје мезенхималне матичне ћелије *in vitro*. Испитивани рутенијум(II) комплекси су испољили израженије цитотоксичано дејство према мезенхималним матичним ћелијама мишева од оксалиплатине *in vitro*. Иначе, мезенхималне матичне ћелије поседују протуморски потенцијал и имају улога у развоју резистенције на хемиотерапеутике, стога је цитотоксично дејство испитиваних комплекса према њима од изузетне важности, јер доприноси целокупној антитуморској ефикасности.

Показано је да испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују цитотоксичан ефекат *in vitro* посредством индукције некрозе ћелије и инхибицијом прогресије ћелијског циклуса, доминантно заустављањем ћелијског циклуса у G2/M фази. Резултати овог истраживања указују да испитивани рутенијум(II) комплекси, а нарочито Ru-1, инхибирају раст хетеротопског карцинома колона миша након интраперитонеалне примене, слично оксалиплатини која је коришћена као референтна супстанца. С друге стране, испитивани рутенијум(II) комплекси су показали израженију хепатотоксичност, нефротоксичност и кардиотоксичност у поређењу са оксалиплатином. Забележену нефротоксичност и кардиотоксичност је могуће повезати са редокс дисбалансом у ткивима срца и бубрега третираних мишева, који се огледао кроз повишен индекс липидне пероксидације у поменутим ткивима. Овакав налаз указује на то да је један од могућих механизма којим рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују системске токсичне ефекте, управо индуковање оксидационог стреса. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси су довели и до повећане заступљености ћелија урођеног (NK и NKT ћелија) и стеченог имунитета (CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита) у периферној крви третираних мишева, које имају значајну улогу у препознавању и елиминацији туморских ћелија, што указује на то да је могући механизам дејства ових комплекса управо индуковање имуногене ћелијске смрти. Интеракција између рутенијум(II) терпиридин комплекса, ћелија имуног система и туморских ћелија у *in vivo* окружењу, је заправо могуће објашњење израженије *in vivo* антитуморске активности у односу на цитотоксични ефекат који ови комплекси постижу *in vitro*.

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

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података "Medline" и "CoBSON" помоћу следећих кључних речи: "*ruthenium(II) complexes*", "*oxaliplatin*", "*colon carcinoma*" "*citotoxicity*", "*CT26*", "*mesenchymal stem cells*", "*BALB/c*", утврђено је да до сада није спроведена студија у којој је анализирана цитотоксичност рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и у *in vivo*. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Маје Савић под називом „Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“ представља резултат оригиналног научног рада.

## 2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

### А. Лични подаци

Маја Савић (рођено Јовановић), рођена је 01. априла 1989. године у Аранђеловцу. Основно образовање је започела у свом завичају у Основној школи “Живко Томић” у селу Блазнава, године 1996. и исту завршила 2004. године у селу Доња Шаторња, као ђак генерације и носилац дипломе “Вук С. Караџић”. Даље школовање у периоду од 2004.-2008. године је наставила у Београду, где је завршила Средњу медицинску школу у Општини Звездара, чиме је стекла звање - фармацеутски техничар. Након завршетка средње школе, 2008. године, уписала је Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, смер Интегрисане академске студије фармације и на истом дипломирала 15. јула 2013. године, са просечном оценом 9,10 и тиме стекла звање - магистар фармације. Након дипломирања, исте године, 2013. је уписала Докторске академске студије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит на изборном подручју Матичне ћелије у биомедицинским наукама, положила је 17. октобра 2016. године са оценом 9. Стручни испит за магистра фармације је положила пред комисијом Министарства здравља, 27. јуна 2019. године. Специјализант је Токсиколошке хемије.

Од 2013. године се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Института Факултета медицинских наука и стални члан истраживачке групе која се бави бројним научним пројектима у оквиру ове лабораторије. Ангажована је као коистраживач на јуниор пројектима Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Аутор је радова публикованих у међународним часописима и учесник је на међународним конгресима.

Од маја 2014. године је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, прво као сарадник у настави, а потом као асистент за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

### Б: Списак објављених радова (прописани минимум услова за одбрану докторске дисертације)

1. **Savic M**, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Stankovic V, Rilak A, Arsenijevic N, Milovanovic M. Antitumor activity of ruthenium(II) terpyridine complexes towards colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*. 2020;25(20):4699. **M22**
2. Mihajlovic K, Milosavljevic I, Jeremic J, **Savic M**, Sretenovic J, Srejovic IM, Zivkovic VI, Jovicic N, Paunovic M, Bolevich S, Jakovljevic V, Novokmet S. Redox and

apoptotic potential of novel ruthenium complexes in the rat blood and heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021;99(2):207-217. **M23**

3. Milutinović MM, Čanović PP, Stevanović D, Masnikosa R, Vraneš M, Tot A, Zarić MM, Simović Marković B, Misirkić Marjanović M, Vučićević Lj, Savić M, Jakovljević V, Trajković V, Volarević V, Kanjevac T, Rilak Simović A. Newly Synthesized Heteronuclear Ruthenium(II)/Ferrocene Complexes Suppress the Growth of Mammary Carcinoma in 4T1-Treated BALB/c Mice by Promoting Activation of Antitumor Immunity. *Organometallics.* 2018,37(22):4250-4266. **M21a**

#### 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 остали су исти. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном. Докторска дисертација кандидата Маје Савић под називом „Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“ написана је на 133 странице и садржи следећа поглавља: увод, циљеве истраживања, материјал и методе, резултате, дискусију, закључке, литературу и скраћенице.

У уводном делу кандидат је цитирајући релевантну литературу, изложио познате чињенице у вези са одликама и развојем тумора и како металофармацеутици утичу на ћелијске механизме кроз осврт на ћелијски циклус, типове ћелијске смрти, имунски одговор и оксидациони стрес. Посебна пажња је посвећена досадашњим достигнућима у области развоја металофармацеутика, њиховим карактеристика, механизмима дејства и системској токсичности.

Јасно су постављени циљ (испитати антитуморски ефекат два рутенијум(II) терпиридин комплекса ( $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}] - \text{Ru-1}$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}] - \text{Ru-2}$ ) на хумане и мишје ћелијске линије карцинома колона *in vitro* и у анималном експерименталном моделу карцинома колона миша *in vivo*) и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљем (МТТ тестом испитати потенцијалну цитотоксичност комплекса *in vitro*; LDH и AnnexinV/PI тестом утврдити доминантан тип ћелијске смрти изазване испитиваним комплексима; испитати утицај комплекса на раст хетеротопског карцинома колона који је индукован субкутаном инјекцијом сингених СТ26 ћелија у дорзолумбалну регију BALB/c мишева, праћењем волумена тумора; испитати потенцијалну системску токсичност испитиваних комплекса одређивањем концентрације аспартат аминотрансферазе, аланин аминотрансферазе, урее и креатинина у серуму и патохистолошком анализом препарата ткива изолованих органа и тумора; испитати утицај комплекса на заступљености ћелија имуног система у периферној крви и оксидациони статус у здравом и туморском ткиву) истраживања.

Материјал и методологија рада, подударни са наведеним у пријави дисертације, презентовани су на одговарајући начин и врло прецизно. Детаљно су описане све технике коришћене у студији: МТТ и LDH тест, AnnexinV/PI тест за детекцију апоптозе, индукција хетеротопског карцинома колона код BALB/c мишева и праћење раста тумора, патохистолошка анализа ткивних препарата, одређивање параметара оксидационог стреса и антиоксидативне заштите и проточна цитофлуорометријска анализа садржаја ДНК у живим ћелијама (анализа ћелијског циклуса) и анализа заступљености појединих ћелија периферне крви.

Резултати истраживања су систематично приказани и документовани са 14 слика, 3 табеле, 39 графика и 3 схеме. Показано је да комплекси рутенијума(II) испољавају умерену до јаку цитотоксичност према хуманим (HCT116 и SW480) и мишјој (СТ26)

ћелијској линији карцинома колона и мишијим мезенхималним матичним ћелијама, са вредностима  $IC_{50}$  у распону од 19,1 до 167,3  $\mu M$ . Рутенијум(II) терпиридински комплекси су код хуманих и мишијих ћелија карцинома колона индуковали апоптозу у ниском проценту, док је тај проценат био знатно виши код мишијих мезенхималних матичних ћелија. Са друге стране, комплекси рутенијума(II) су индуковали у значајном проценту некрозу ћелија карцинома колона и мишијих мезенхималних матичних ћелија. Такође, оба комплекса су специфично за ћелијску линију индуковали поремећаје ћелијског циклуса, односно индуковали су застој најчешће у G2/M фази ћелијског циклуса. Комплекс  $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl]$  је значајно инхибирао раст примарног хетеротопског тумора код мишева, подједнако или чак боље од оксалиплатине, у зависности од примењене дозе. Оба испитивана рутенијум(II) терпиридин комплекса су довела до озбиљнијег оштећења јетре, бубрега и срца, у поређењу са оксалиплатином, што је процењено на основу биохемијских анализа (урее, креатинина, АСТ и АЛТ) и хистопатолошке анализе органа. С обзиром на забележене повишене вредности индекса липидне пероксидације у ткиву срца и бубрега код мишева третираних комплексима рутенијума(II), претпоставља се да индукција оксидативног стреса услед њихове примене може имати улогу у испољавању системске токсичности.

У поглављу дискусија детаљно су анализирани добијени резултати истраживања и упоређивани са подацима из литературе из исте области. Резултати су дискутовани у контексту сличних, различитих па чак и опречних података о цитотоксичном дејству и токсичном профилу рутенијум(II) комплекса.

Коришћена литература је адекватна по обиму, садржају и релевантности.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси испољавају цитотоксичан ефекат *in vitro*, који је компарабилан са ефектом који остварује оксалиплатина (референтни хемиотерапеутик), према свим тестираним туморским ћелијским линијама:
  - ћелијама карцинома колона изолованим из BALB/c мишева - CT26,
  - ћелијама хуманог епителног колоректалног аденокарцинома - SW480,
  - ћелијама хуманог епителног колоректалног карцинома - HCT116.
2. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси испољавају израженије цитотоксичано дејство од оксалиплатине *in vitro* према мезенхималним матичним ћелијама изолованим из костне сржи C57Bl/6 мишева – mMSC, које поседују протуморски потенцијал и имају улога у развоју резистенције на хемиотерапеутике.
3. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују цитотоксичан ефекат *in vitro* посредством индукције некрозе ћелије и инхибицијом прогресије ћелијског циклуса, доминантно заустављањем ћелијског циклуса у G2/M фази.
4. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси инхибирају раст хетеротопског карцинома колона миша након интраперитонеалне примене.
  - Ru-1 комплекс је потентнији антитуморски агенс од Ru-2 комплекса.
  - Ru-1 комплекс у дози од 2 mg/kg инхибира раст карцинома колона миша подједнако као и оксалиплатина, док у дози од 5 mg/kg супримира раст карцинома колона миша боље од оксалиплатине.

5. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси испољавају дозно-зависну хепатотоксичност, нефротоксичност и кардиотоксичност.
6. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси доводе повећане заступљености ћелија урођеног (NK и NKT ћелија) и стеченог имунитета (CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита) у периферној крви третираних мишева, које имају значајну улогу у препознавању и елиминацији туморских ћелија.
7. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси доводе до редокс дисбаланса у појединим ткивима третираних мишева (повишен индекс липидне пероксидације у ткивима срца и бубрега). Овакав налаз указује на то да је један од могућих механизма којим рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују системске токсичне ефекте, управо индуковање оксидационог стреса.

## **2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси**

Добијени резултати истраживања указују на значај даљих испитивања структурно сличних рутенијум(II) комплекса, као потенцијалних антитуморских металофармацеутика.

## **2.7. Начин презентовања резултата научној јавности**

Резултати ове докторске дисертације су до сада објављени у једном оригиналном научном раду у међународном часопису категорије M22 и презентовани у виду постер презентација на више међународних конгреса категорије M30.

1. **Savic M, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Stankovic V, Rilak A, Arsenijevic N, Milovanovic M.** Antitumor activity of ruthenium(II) terpyridine complexes towards colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*. 2020;25(20):4699. **M22**

## ЗАКЉУЧАК

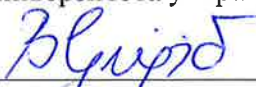
Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Маје Савић под називом „Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“, на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру тезе засновано на савременим сазнањима и валидираној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Маје Савић, под менторством проф. др Слободана Новокмета, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, представља оригинални научни допринос који је од практичног значаја с обзиром да недвосмислено показује да рутенијум(II) терпиридински комплекси имају изражено антитуморско дејство *in vivo*, али уз много израженије токсичне ефекте него што се очекивало, па се стога ове информације могу користити као смернице за дизајн и синтезу нових комплекса рутенијума(II), који ће имати побољшани профил токсичности уз задржану цитотоксичност и који ће се потенцијално користити као металофармацеутици за лечење карцинома.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторске дисертације кандидата Маје Савић под називом „Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“, буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

**Проф. др Биљана Љујић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Генетика, председник;



**Доц. др Петар Чановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;



**Проф. др Тибор Ј. Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета  
у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан.



У Крагујевцу, 01.04.2022. године