

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ
Бр. 25-664/2
05 NOV 2025 год.
ПРИШТИНА

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ
Бр. 03-2820
03.11.2025 год.
ПРИШТИНА

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - КОСОВСКА МИТРОВИЦА

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај комисије за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације кандидата др Ане Антонијевић.

На основу одлуке Наставно-научног већа Медицинског факултета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици, бр.05-2219, од 24.9.2025.године, именована је комисија за оцену подобности теме и кандидата др Ана Антонијевић за израду докторске дисертације под насловом „ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) СА ЕСТРИМА ПРОПИЛЕНДИАМИНСКИХ ДЕРИВАТА ФЕНИЛАЛАНИНА“

Именована је комисија у саставу:

1. Доц.др Андријана Карановић- председник
2. Проф.др Иван Јовановић- члан
3. Доц.др Невена Гајовић- члан - ментор

Након прегледаног материјала достављеног од стране кандидата, комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Оцена подобности кандидата

Др Ана Антонијевић рођена је 12.7.1989.године у Косовској Митровици. Медицински факултет Универзитета у Приштини уписала је 2008.године, а дипломирала је 2014.године, са просечном оценом у току студирања 8,76. Докторске студије уписала је 2014/15 године на Медицинском факултету Универзитета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици.

Радни однос засновала је у Заводу за јавно здравље Косовска Митровица 23.9.2014.године, као доктор у Центру за хуману микробиологију. Специјалистичке студије из Медицинске микробиологије уписала је 2015/16 године и положила специјалистички испит на Медицинском факултету Универзитета у Приштини 2021.године са одличним успехом. Дана 15.5.2021. године засновала је радни однос као сарадник у настави на предмету

Микробиологија и имунологија на Медицинском факултету Универзитета у Приштини.

Ужу специјализацију из области Вирусологија уписала је 2024/25 године на Медицинском факултету Универзитета у Београду.

Списак публикованих радова кандидата:

1. Harrell CR, Djonov V, Antonijevic A, Volarevic V. NLRP3 Inflammasome as a Potentially New Therapeutic Target of Mesenchymal Stem Cells and Their Exosomes in the Treatment of Inflammatory Eye Diseases. *Cells*. 2023 Sep 21;12(18):2327. doi: 10.3390/cells12182327.PMID: 37759549

Списак публикованих радова ментора:

1. Milosevic J, Jurisevic M, Grbovic V, Jovanovic I, Gajovic N, Jurisic-Skevin A. Potential Protective Role of Galectin-3 in Patients with Gonarthrosis and Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(18):11480.
2. Minic Janicijevic S, Jovanovic IP, Gajovic NM, Jurisevic MM, Debnath M, Arsenijevic NN, Borovcanin MM. Galectin-3 mediated risk of inflammation in stable schizophrenia, with only possible secondary consequences for cognition. *World J Psychiatry*. 2022;12(9):1183 -1193.
3. Savic G, Stevanovic I, Mihajlovic D, Jurisevic M, Gajovic N, Jovanovic I, Ninkovic M. MMP-9/BDNF ratio predicts more severe COVID-19 outcomes. *Int J Med Sci*. 2022;19(13):1903-1911.
4. Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Sekulic S, Jocic M, Jovanovic M, Lukic R, Jovanovic I, Radovanovic D, Arsenijevic N. An ti-PD-1 therapy activates tumoricidal properties of NKT cells and contributes to the overall deceleration of tumor progression in a model of murine mammary carcinoma. *Vojnosanit Pregl*. 2022;79(8):764-773.
5. Jovicic-Milic S, Jevtic V, Radisavljevic S, Petrovic B, Radojevic I, Rakovic I, Petrovic Dj, Stojkovic D, Jurisevic M, Gajovic N, Petrovic Andjela, Arsenijevic N, Jovanovic I, Klisuric O, Vukovic N, Kacaniovic M. Synthesis, characterization, DNA interactions and biological activity of new palladium(II) complexes with some derivatives of 2-aminothiazoles. *Journal of inorganic biochemistry* 2022;233.
6. Dimitrijevic Stojanovic M, Franich A, Jurisevic M, Gajovic N, Arsenijevic N, Jovanovic I, Stojanovic B, Mitrovic S, Kljun J, Rajkovic S, Zivkovic M. Platinum(II) complexes with malonic acids: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo antitumor activity and interactions with biomolecules. *Journal of*

Inorganic Biochemistry 2022; 231: 111773 DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111773

7. Sekulic Markovic S, Gajovic N, Jurisevic M, Jovanovic M, Popovska Jovicic B, Arsenijevic N, Mijailovic Z, Jovanovic M, Dolicanin Z, Jovanovic I. Galectin-

1 as the new player in staging and prognosis of COVID-19. Scientific Reports 2022; DOI: 10.1038/s41598-021-04602-z

8. Jovic M, Arsenijevic N, Gajovic N, Jurisevic M, Jovanovic I, Jovanovic M, Zdravkovic N, Maric V, Jovanovic M. Anemia of inflammation in patients with colorectal cancer: correlation with interleukin-1, interleukin-33 and galectin-1. J Med Biochem. 2021;40:1–12.

9. Jovanovic M, Geller D, Gajovic N, Jurisevic M, Arsenijevic N, Jovanovic M, Supic G, Vojvodic D, Jovanovic I. Dual blockage of PD-L/PD-1 and IL33/ST2 axes slows tumor growth and improves antitumor immunity by boosting NK cells. Life Sci. 2022;289:120214.

10. Sekulic Markovic S, Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Arsenijevic N, Jovanovic M, Jovanovic M, Mijailovic Z, Lukic S, Zornic N, Vukicevic V, Stojanovic

J, Maric V, Jovic M and Jovanovic I. IL 33 Correlates With COVID-19 Severity, Radiographic and Clinical Finding. Frontiers in Medicine. 2021;8:749569.

11. Jovanovic-Stevic S, Cocic D, Puchta R, Bogojeski J, Jurisevic M, Gajovic N, Jakovljevic S, Arsenijevic N, Jovanovic I, Petrovic B. Assessment of biological activity of the caffeine-derived Pt (II) and Pd (II) complexes. Appl Organomet Chem.. 2021; doi.org/10.1002/aoc.6532.

12. Jovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Jovanovic M, Zdravkovic N, Arsenijevic N, Vukovic Dejanovic V, Maric V, Milev B, Jovanovic M. Colorectal carcinoma:

evaluation of systemic values of interleukin-1 and interleukin-33 in patients with and without thrombocytosis. Vojnosanit pregl. 2021;78(6): 627-634.

13. Petrovic Dj, Jovicic Milic S, Djukic M, Radojevic I, Jelic R, Jurisevic M, Radic G, Gajovic N, Arsenijevic N, Jovanovic I, Markovic N, Stojkovic D, Jevtic

V. Synthesis, characterization, HSA/DNA binding, cytotoxicity study, and antimicrobial activity of new palladium(II) complexes with some esters of (S,S)- propylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)butanoic acid. Inorganica Chimica Acta. 2021;528:120601.

14. Jovanovic MM, Jurisevic MM, Gajovic NM, Arsenijevic NN, Jovic MV, Jovanovic IP, Zdravkovic ND, Djukic AL, Maric VJ, Jovanovic MM. Increased

Severity of Ulcerative Colitis in the Terminal Phase of the Metabolic Syndrome. Tohoku J Exp Med. 2021;254(3):171-182.

15. Konovalov B, Franich A, Jovanović M, Jurisević M, Gajović N, Jovanović M, Arsenijević N, Maric V, Jovanović I, Živković M Rajković S. Synthesis,

DNA/BSA-binding affinity and cytotoxicity of dinuclear platinum (II) complexes with 1,6-naphthyridine bridging ligand. *Appl Organomet Chem* 2020; DOI: 10.1002/aoc.6112.

16. Pavlovic M, Jurisevic M, Gajovic N, Mitrovic S, Jovanovic M, Radosavljevic G, Pantic J, Radovanovic D, Arsenijevic N, Jovanovic I. IL-32 expression

associates with lymph vessel invasion in intestinal type of gastric cancer. *Vojnosanit Pregl* 2020; 77(8): 816–825.

17. Borovcanin M, Minic Janicijevic S, Jovanovic I, Gajovic N, Jurisevic M and Arsenijevic N. Type 17 Immune Response Facilitates Progression of Inflammation

and Correlates with Cognition in Stable Schizophrenia. *Diagnostics* 2020; 10, 926; doi:10.3390/diagnostics10110926.

18. Bošković M, Franich A, Rajković S, Jovanović M, Jurisević M, Gajović N, Jovanović M, Arsenijević N, Jovanović I and Živković M. Potential antitumor

effect of newly synthesized dinuclear 1,5-naphthyridine-bridging palladium (II) complexes. *ChemistrySelect* 2020, 5: 10549-10555.

19. Lukic R, Cupic M, Gajovic N, Jurisevic M, Mijailovic Z, Davidovic B, Kujundzic B, Joksimovic B, Arsenijevic N, Jovanovic I. Increased systemic sST2 in patients with end stage renal disease contributes to milder liver damage during HCV infection. *J Infect Dev Ctries.* 2020; 14(5): 519-526.

20. Jovanovic M, Simovic Markovic B, Gajovic N, Jurisevic M, Djukic A, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic A, Zdravkovic N. Metabolic syndrome attenuates ulcerative colitis: Correlation with interleukin-10 and galectin-3 expression. *World J Gastroenterol.* 2019; 25(43): 6465-6482.

21. Stojanovic B, Jovanovic I, Stojanovic BS, Stojanovic MD, Gajovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. *Eur J Immunol.* 2019; 49(6): 940-946.

22. Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Simovic Markovic B, Maric V, Jovanovic M, Arsenijevic N, Zdravkovic N. Fecal sST2 correlates with disease severity

of ulcerative colitis. *Vojnosanit Pregl* 2019; 76(11): 1153–1161.

23. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Mirkovic D, Milev B, Maric V, Arsenijevic N. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit Pregl* 2019; 76(10): 1037–1044.

24. Gajovic N, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML and Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocrine-related cancer* 2018; 25: 493-507.

25. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A and Jovanovic I. Fecal galectin-3: A new promising biomarker for severity and progression of colorectal carcinoma. *Mediators of Inflammation* 2018; DOI: 10.1155/2018/8031328.

26. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, Jovanovic M, Zdravkovic N, Kanjevac T, Harrell CR, Fellabaum C, Dolicanin Z, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Therap Adv Gastroenterol.* 2018 Aug 24;11:1756284818793558. doi: 10.1177/1756284818793558.
27. Borovcanin MM, Janicijevic SM, Jovanovic IP, Gajovic N, Arsenijevic NN, Lukic ML. IL-33/ST2 Pathway and Galectin-3 as a New Analytes in Pathogenesis and Cardiometabolic Risk Evaluation in Psychosis. *Front Psychiatry.* 2018 Jun 22;9:271. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00271.
28. Jurisevic M, Jagic N, Gajovic N, Arsenijevic A, Jovanovic M, Milovanovic M, Pantic J, Jovanovic I, Sabo T, Radosavljevic G, Arsenijevic N. O,O'-diethyl- (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl) propanoate dihydrochloride enhances influx of effective NK and NKT cells in murine breast cancer. *Vojnosanit pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP180723149J.
29. Pavlovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Mitrovic S, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Jovanovic I. Diverse Expression of IL-32 in Diffuse and Intestinal Types of Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2018; 2018:6578273.
30. Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Gajovic NM, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. The frog skin host-defense peptide frenatin 2.1S enhances recruitment, activation and tumoricidal capacity of NK cells. *Peptides* 2017; 93:44-50.
31. Lukic R, Gajovic N, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, Popovska Jovicic B, Arsenijevic N. Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Dis Markers.* 2017;2017:6275987.
32. Vasovic M, Gajovic N, Brajkovic D, Jovanovic M, Zdravkovic N, Kanjevac T. The relationship between the immune system and oral manifestations of inflammatory bowel disease: a review. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(3):302-310..
33. Petrovic A, Markovic V, Maric V, Gajovic N. Metformin as a potential antitumor agent. *Ser J Exp Clin Res.* 2022; doi: 2478/sjecr-2022-0023.
34. Maric V, Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Jovanovic M, Jovanovic I. Increased IL-33 and IL-17 in colorectal carcinoma patients with severe disease. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi:10.2478/sjecr-2018-0034.
35. Jovanovic M, Gajovic N, Lukic ML, Popovic A, Jovanovic I. Synergism of PDL/PD1 and IL33/ST2 axis in tumor immunology. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi:10.2478/sjecr-2018-0033.
36. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, Poljarevic J, Sabo T, Vojvodic D, Radosavljevic G, Arsenijevic N. The organic ester O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride

attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget*, 2018; 9(46): 28195-28212.

37. Gajovic N, Jovanovic I, Ilic A, Jeremic N, Jakovljevic V, Arsenijevic N, Lukic M. Diabetes mellitus directs NKT cells toward type 2 and regulatory phenotype *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17 (1): 35-41.

38. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Serb J Exp Clin Res*. DOI: 10.1515/SJECR-2016-0042

39. Lukic R, Lukovic B, Gajović N, Prljic S, Đukic S Mechanism of intracellular chlamydiae survival *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17 (2): 145-151.

40. Jovanović I, Gajović N, Radosavljević G, Pantić J, Pejnović N, Arsenijević N, Lukić M. Innate lymphoid cells: roles in tumour genesis and progression *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16 (2): 85-90.

41. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Gajovic N, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- β as a marker of ulcerative colitis and disease severity. *Ser J Exp Clin Res* DOI: 10.1515/sjecr-2017-001

2. Оцена подобности теме

2.1. Оцена формулисања наслова теме

Кандидат је предложио наслов теме “ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) СА ЕСТРИМА ПРОПИЛЕНДИАМИНСКИХ ДЕРИВАТА ФЕНИЛАЛАНИНА”. Наслов теме је потпун, прецизан, јасан, усклађен са постављеним циљевима и хипотезом и јасно указује на проблем који ће се у раду обрађивати. Тема је актуелна и значајна. Комисија сматра да је наслов теме добро одабран, да се истраживач може посветити целокупном истраживању, да ће материјал бити обрађен са различитих аспеката, као и да се у тој области могу добити стручни и научни подаци од ширег интереса. Оригинални научни допринос истраживања састоји се у томе, да према нашим сазнањима не постоји пуно релевантних сличних истраживања, какво је одређено у овом пројекту.

2.2. Оцена формулисања циљева истраживања

Кандидат је таксативно и веома прецизно навео следеће циљеве истраживања:

- 1) синтеза и карактеризација новосинтетисаних једињења, на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвених, нуклеарно-магнетно-резонанционих и масених спектра;

- 2) испитати потенцијални туморицидни ефекат новосинтетисаних једињења ин витро на мишијим и хуманим ћелијским линијама колоректаног карцинома (СТ26, НСТ116), карцинома дојке (4Т1, МСF7);
- 3) одредити релативни однос некротске и апоптотске смрти туморских ћелија изазване новосинтетисаним комплексима и испитати молекулске механизме укључене у доминантан тип ћелијске смрти;
- 4) испитати утицај новосинтетисаних комплекса на ћелијски циклус туморских ћелија и на експресију молекула укључених у контролу ћелијског циклуса;
- 5) анализирати утицај новосинтетисаних комплекса на пролиферативни потенцијал *in vitro*, спровођењем теста миграције;
- 6) испитати антимикробно дејство новосинтетисаних комплекса на сојевима више врста микроорганизама;
- 7) испитати имуномодулаторна својства новосинтетисаних комплекса.

Циљеви су специфични, оствариви и релевантни. Наведени циљеви су у потпуном сагласју са темом докторске дисертације и њиховим испуњењем се свеобухватно обрађује наведена тема и очекују адекватни закључци.

2.3. Оцена постављене хипотезе

Хипотеза истраживања је постављена поштујући правила методологије научно-истраживачког рада у складу са постављеним циљевима и планираним методолошким приступом.

2.4. Оцена примењене методологије истраживања

Описани методолошки поступци у потпуности су у складу са насловом и постављеним циљевима, као и постављеним хипотезама и омогућују достизање адекватних научно примењених закључака.

Популација ћелија која се истражује:

Новосинтетисани комплекси платине(II)

Dichlorido-(O,O'-diethyl-(S,S)-propylenediamine-N,N'-di-2-(2-benzyl)acetate)-platinum(II), [PtCl₂(Et₂-S,S-pddba)] (C1),

- Dichlorido-(O,O'-dipropyl-(S,S)-propylenediamine-N,N'-di-2-(2-benzyl)acetate)-platinum(II), [PtCl₂(Pr₂-S,S-pddba)] (C2),
- Dichlorido-(O,O'-dibutyl-(S,S)-propylenediamine-N,N'-di-2-(2-benzyl)acetate)-platinum(II), [PtCl₂(Bu₂-S,S-pddba)] (C3),
- Dichlorido-(O,O'-dipentyl-(S,S)-propylenediamine-N,N'-di-2-(2-benzyl)acetate)-platinum(II), [PtCl₂(Pe₂-S,S-pddba)] (C4). Ћелијске линије

- Ћелијска линија мишијег карцинома дојке 4T1 (American Type Culture Collection CRL-2539, ATCC, USA),
- Мишији карцином колона CT26 (American Type Culture Collection CRL-2638, ATCC, USA),
- Мишије мезенхималне матичне ћелије (mMSC; Gibco Catalog number S1502-100) изоловане из коштане сржи C57BL/6 мишева користиће се као контрола,
- Ћелијска линија хуманог карцинома дојке MCF-7 (American Type Culture Collection ATCC® HTB-22™ USA),
- Ћелијска линија хуманог колоректалног карцинома HCT 116 (American Type Culture Collection ATCC® CCL-247™ USA),
- Ћелијска линија фибробласта плућа MRC-5 (American Type Culture Collection ATCC® CCL-171™ USA), користиће се као контрола.

За култивацију наведених линија туморских ћелија миша користиће се Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) у који је додат Fetal Bovine Serum, L-glutamine, penicillin/streptomycin и неесенцијалне аминокиселине. Туморске ћелије ће се узгајати у инкубатору на 37°C са 5% CO₂.

Референтни сојеви микроорганизама

За испитивање антимикробне активности комплекса платине(II) користиће се наведени референтни сојеви микроорганизама *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Rhodococcus equi* (ATCC 6939), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Proteus mirabilis* (ATCC 25933); *Candida albicans* (ATCC 10231) и *Saharomices cerevisiae* (ATCC 9763).

Узорковање

Синтеза и карактеризација динуклераних комплекса

Синтеза и карактеризација новосинтетисаних бидентатно координованих комплекса платине(II) са естрима (етил, пропил, бутил, пентил) 1.3-пропилендиаминских деривата фениланина ће бити спроведена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

Кинетичка мерења

Кинетика и механизам супституционих реакција комплекса изучаваће се на Stopped-flow instrumentu и Perkin Elmer Lambda 35 спектрофотометру. Реакције ће се испитивати на pH = 7,2 (у 25 mM Hepes *puferu*) и температури 37 °C, као реакције

псеудо-првог реда (концентрација лиганда у вишку). Кинетичка мерења ће бити спроведена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

Интеракције комплекса са DNA и HSA

Интеракције комплекса са DNA ће бити проучаване помоћу Uv-Vis спектрофотометрије и флуоресцентне спектроскопије. Да би се одредио афинитет и начин везивања комплекса за DNA, реакције ће бити изучаване у присуству етидијум бромида као интеркалационог агенса и у присуству Hoechst 33258 (Hoe) реагенса као индикатора везивања преко мањих жлебова. Интеракције са HSA ће се изучавати помоћу флуоресцентне спектроскопије и у присуству еозина и ибупрофена, да би се одредило тачно место везивање испитиваних комплекса за HSA. Додатно, интеракције комплекса са DNA и HSA ће бити иучаване и применом молекулском докинга.

Тестови за испитивање цитотоксичности

Вијабилност туморских ћелија третираних новосинтетисаним комплексима платине(II) ће се испитати МТТ тестом. У метаболички активним ћелијама, МТТ се редукује до формазана. Како је митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа) активна само у живим ћелијама, тако је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија. Туморске ћелије ће се излагати новосинтетисаним комплексима током 24 часа и 48 часова у двоструко опадајућим концентрацијама (500 μ M-3,9 μ M). По истеку инкубационог периода, у сваки бунар ће се додати по 100 μ l медијума са 20 % МТТ раствора (5mg/1ml у PBS-у). Плоче ће се инкубирати 4 сата. Оптичку густину (ОД) одредићемо на таласној дужини од 595nm, користећи MicroplatemultimodedetectorZenyth 3100, AnthosLabtecInstruments, Austria. Експерименти ће се радити у трипликату, и поновити три пута.

Вијабилност ћелија ће се рачунати помоћу формуле: (14)

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E-K)/(H-K) \times 100$$

E-ћелије третиране испитиваним комплексом (апсорбанца); K- контрола (апсорбанца);

H- нетретиране ћелије (апсорбанца).

У свим даљим експериментима испитиваће се биолошка активност комплекса који покаже најбољи индекс селективности МТТ тестом.

Анализа врсте ћелијске смрти у третираним туморским ћелијама

Цитотоксични потенцијал новосинтетисаних комплекса анализираће се проточном цитометријом, на ћелијама бојеним Annexin V и propidium-jodidom (PI). Када ћелије у фласковима достигну конфлуентност од око 70%, медијум ће бити замењен медијумом са додатком испитиваног комплекса платине(II) у концентрацији која одговара вредностима IC50. IC50 вредности ће бити добијене из серије предексперимента (MTT тест). Контролне ћелије неће бити фармаколошки третиране. Након 24 сата инкубације ћелије ће бити „опране“ комплетним медијумом и ресуспендоване у пуферу. Затим ће се додати по 5µl Annexin-a V-FITC (BDPharmingen, SanDiego, California, USA) и 5µl PI (50 µg/ml PBS-a) (SigmaAldrich, Nemačka). После истека инкубације од 15 минута на собној температури и у мраку, у сваки узорак ће се додати по 400 µl 1X пуфера. На проточном цитометру анализираће се 20000 догађаја ((FACS Caliburflowcytometer, BDBiosciences, SanJose, USA), а подаци ће се обрадити у FlowJo програму (TreeStar). Анализом ће се дефинисати: AnnexinV (-) и PI(-) као живе ћелије, AnnexinV (+) и PI (-) као ћелије у раној фази апоптозе, а AnnexinV (+); PI(+) као ћелије у касној фази апоптозе. Такође ће се мерити и експресија кључних молекула за регулацију ћелијског циклуса: ciklin D3 (ab28283, Abcam Cambridge, United Kingdom), ciklin E (MA5-14336, Thermo fisher scientific, USA), p16 (ab211542, Abcam Cambridge, United Kingdom), p21 (ab188224, Abcam Cambridge, United Kingdom) и p27 (ab215434, Abcam Cambridge, United Kingdom). Туморске ћелије биће третиране испитиваним комплексима у концентрацији која одговара вредностима IC50 које ће бити добијене из претходне серије експеримената.

Анализа експресије про- и анти-апоптотских протеина

Проточном цитометријом биће анализирана и експресија про-апоптотског протеина Вах, анти-апоптотског протеина Bcl-2 и проценат ћелија које садрже активну каспазу-3. Туморске ћелије биће инкубиране 24 сата у медијуму са додатком новосинтетисаног комплекса у концентрацији која одговара вредностима IC50, или у чистом комплетном медијуму (контролне ћелије). Анализираће се 20000 догађаја на FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у FlowJo програму (Tree Star).

Анализа експресије Ki67

За анализу експресије Ki67 у туморским ћелијама које ће бити третиране IC50 концентрацијама новосинтетисаних комплекса платине(II) током 24 часа користиће се проточна цитометрија. Анализираће се 20000 догађаја на FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у FlowJo програму (Tree Star).

Анализа ћелијског циклуса

За анализу процентуалне заступљености малигних ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса биће коришћен кит Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA). Након постизања конфлуентности у фласковима од 70-80%, туморске ћелије ће бити третиране носоиспитиваним комплексима платине(II), као и са свежим медијумом (контрола) 24 часа, у стандардним условима. Ћелије ће бити ресуспендоване у густини од 5×10^5 ћелија/ml, а за даљу анализу биће одмерено 0.5ml ћелијске суспензије у коју ће се додати 1µl Ruby боје. Узорци ће након тога бити инкубирани 30 минута на температури од 37°C, ван домаћаја светлости. За анализу ћелијског циклуса користиће се проточни цитометар FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у FlowJo програму (Tree Star).

"Scratch" тест

Тест миграције или "Scratch" тест ће се користити за анализу миграције туморских ћелија ин витро (15). У плоче са 6 бунара у трипликату туморске ћелије ће бити засејане и гајене до постизања конфлуентног монослоја. Стерилним наставком за микропипету, нежним покретом под углом од 30 степени, направитиће се "повреда" у сваком од бунара. Након тога, ћелије ће бити опране PBS-ом, а затим ће се додати чист медијум, или медијум са испитиваним комплексом платине(II). Ћелије ће бити третиране новосинтетисаним комплексом у концентрацији која одговара претходно израчунатим IC50 вредностима. Након замене медијума уследиће инкубација у стандардним условима. Промене у ћелијском кретању биће снимане у 0, 4, 20 и 24. часу након замене медијума, помоћу инвертног микроскопа на увећању 10x. Снимке ће бити анализиране уз помоћ софтвера ImageJ.

Имуномодулација

Тестирање имуномодулаторног ефекта ће се спровести у циљу испитивања утицаја новосинтетисаних комплекса на ћелије имунског система. Ћелије ће бити постављене у микротитар плоче од 96 бунара и подељене у неколико група. Ћелије ће бити третиране Конканавалином A/Lipopolisaharidom (ConA/LPS), као активаторима, и испитиваним комплексима у дозама одређеним на основу IC50 вредности.

Ћелије ће бити инкубиране у периоду од 24h, на температури од 37°C, у атмосфери 5% CO₂ и 95% ваздуха. Имуномодулаторни ефекат ће бити испитан коришћењем ELISA теста. ELISA тестом ће бити мерени следећи цитокини: TNF-α, IL-1β, IL-10, IL-12 и IFN-γ.

Евалуација антимикробне активности комплекса платине(II)

Минимална инхибиторна концентрација (енгл. Минимал инхибитору концентратион, MIC) комплекса платине(II) ће бити измерена микродилуционим бујон методом а потом ће се измерити минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација (енгл. Minimal bactericidal/fungicidal concentration, MBC/MFC) (16). Суспензија микроорганизама ће се припремити тако што ће се узети 2-3 бактеријске колоније, односно колоније квасница, стерилном езом са чврсте подлоге након

инкубације од 24 часа. Микроорганизми ће бити ресуспендовани у физиолошком раствору до густине од 0,5 McFarland-a, при чему ће се сматрати да је иницијална концентрација бактерија 108 cfu/ml, а гљивица 106 cfu/ml. Затим се прави разблажења до финалне концентрације 5x105 cfu/ml. У сваки бунар микротитар плоче ће се додати по 0,1ml Mueller-Hinton бујона (Liohilchem, Italy), а у бунаре у којима ће се анализирати гљивице додаће се 0,1ml RPMI 1640. Додаће се по 0,1 ml испитиваних комплекса у први ред бунара (почетна концентрација 2000µg/ml) и правити двострука разблажења. За сваку врсту микроорганизама ће се оставити по две колоне на микротитар плочи у које се неће додавати комплекси, једна ће бити за контролни антибиотик или антимикотик, а у другој ће се контролисати раст микроорганизама. За Грам-позитивне бактерије ће се као контролни антибиотик користити ванкомицин, за Грам-негативне пиперацилин-тазобактам, а за гљивице флуконазол. Додаће се 10 µl бактеријске/гљивичне суспензије у сваки бунар микротитар плоче. Након инкубације од 24h на 36,6°C до 37°C у аеробним условима за бактерије и 48h за гљивице, читаће се резултат коришћењем инвертног огледала. Концентрација комплекса у првом бунару у коме је садржај бистар представљаће МИС. По 10µl раствора из осталих бунара са вишим концентрацијама комплекса ће се засејати на крвни агар са 5% овчје крви (Oxoid, Germany), односно на Сабоурауд-дехтросе агар за гљивице. Плоче ће се инкубирати 24h за бактерије, односно 48h за гљивице. МВС/МФС ће бити она која се налази у суспензији којом је засејана прва плоча на којој нема пораста бактеријских/гљивичних колонија, односно, прва стерилна плоча.

2.5 Оцена подобности установе

Ова експериментална студија спровешће се на Природно-математичком Факултету Универзитета у Крагујевцу и Факултету Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. С обзиром да наведене установе имају све потребне клиничке и лабораторијске услове за извођење овог истраживања, као и значајно искуство у истим, сматрамо да се у оквиру ове установе може спровести истраживање на дату тему.

3. Закључак

Прегледом приложене документације, установљено је да кандидат испуњава све услове за пријаву докторске дисертације, а досадашњи стручни и научни радови кандидата указују да ће истраживање бити спроведено на одговарајући начин. Увидом у приложену документацију чланови Комисије донели су закључак да предложена тема "ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) СА ЕСТРИМА ПРОПИЛЕНДИАМИНСКИХ ДЕРИВАТА ФЕНИЛАЛАНИНА" кандидата др Ане Антонијевић, представља актуелну тему

која може дати оригинални научни допринос у области Микробиологије и Имунологије.

Студија би требало по први пут да испита антитуморски, имуномодулаторни и антимикробни ефекат новосинтетисаних комплекса платине(II) и да објани потенцијални механизам дејства *in vitro*.

Досадашњи стручни и научни рад кандидата др Ане Антонијевић и њеног ментора Доц.др Невене Гајовић, као и актуелност предложене теме, представљају реалну основу да ће ово истраживање бити урађено на адекватан методолошки начин.

С тога Комисија једногласно закључује да су поред законских испуњени и сви остали формални услови и на основу тога предлага Наставно-научном већу Медицинског факултета Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици да кандидату др Ани Антонијевић дозволи израду докторске дисертације са предложеном темом.

Чланови комисије:

1. Доц.др Андријана Карановић- председник
(Медицински факултет у Приштини - Косовска Митровица)
Ужа научна област: Микробиологија и Имунологија



2. Проф.др Иван Јовановић – члан
(Факултет медицинских наука у Крагујевцу)
Ужа научна област: Микробиологија и Имунологија



3. Доц.др Невена Гајовић – члан – ментор
(Факултет медицинских наука у Крагујевцу)
Ужа научна област: Микробиологија и Имунологија


