

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ		
1. Датум и орган који је именовео комисију: 24.05.2021. године, Наставно-научно веће Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду		
2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> :		
1.	Радмила Жеравица презиме и име	доцент звање
	Медицински факултет Нови Сад Универзитет у Новом Саду установа у којој је запослен-а	Патолошка физиологија, 12.07.2016. ужа научна област и датум избора председник функција у комисији
2.	Дрина Јанковић презиме и име	Научни саветник звање
	Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду установа у којој је запослен-а	Радиофармација, 19.05.2010. ужа научна област и датум избора члан функција у комисији
3.	Жељко Пријовић презиме и име	Научни сарадник звање
	Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду установа у којој је запослен-а	Биохемија, 16.12.2019. ужа научна област и датум избора члан функција у комисији
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ		
1. Име, име једног родитеља, презиме: <b>Аљоша, Предраг, Станковић</b>		
2. Датум рођења, општина, држава: <b>26.01.1988. године, Бања Лука, Босна и Херцеговина</b>		
3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив: <b>Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Интегрисане академске студије фармације, Магистар фармације</b>		

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:  
**2014. година, докторске академске студије Клиничка истраживања**

### **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**Синтеза и карактеризација радиофармацеутика на бази суперпарамагнетних наночестица и ефекат дуалне терапије на експерименталном моделу аденокарцинома колона**

### **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, схема, графикона и сл.

Докторска дисертација кандидата Аљоше Станковића посвећена ја испитивању услова синтезе биокомпатибилних суперпарамагнетних наночестица (СМНЧ) на бази  $Fe_3O_4$ , њиховим облагањем и физичко-хемијском карактеризацијом. Након коњугације СМНЧ са јодом-131 обележеним тумор-специфичним моноклонским антителим СС49 (СС49 мАт), испитивано је биолошко понашање радиофармацеутика  $^{131}I$ -СС49-СМНЧ и ефекат дуалне терапије (радионуклидне терапије и магнетне хипертермије) на експерименталном животињском моделу са индукованим аденокарциномом колона.

Докторска дисертација је написана систематично, јасним и разумљивим стилем на 142 странице. Садржи све неопходне делове научног рада који су организовани у 8 поглавља: увод, теоријски део, циљеви и радне хипотезе, експериментални део, резултати и дискусија, закључак, литература и прилог. Дисертација садржи 39 слика, 11 графикона, 16 табела и 5 прилога. Литература са 300 референци у складу је са важећим правилима за цитирање. На почетку докторске дисертације дата је Кључна документацијска информација на српском и енглеском језику.

### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**Наслов** докторске дисертације је јасно и прецизно формулисан, и у потпуности указује на садржај истраживања.

*Комисија за оцену докторске дисертације оцењује да је наслов докторске дисертације јасно формулисан, да је разумљив и у складу са темом и садржајем исте.*

Поглавља **Увод** и **Теоријски део** су написана у складу са разматраном проблематиком. Детаљно је дата теоријска основа за истраживање, са прегледом значаја и принципа наномедицине, радионуклидне терапије и магнетне хипертермије у терапији тумора. Детаљно је дат литературни преглед метода синтезе и облагања површине СМНЧ, као и најновија истраживања обележавања СМНЧ радионуклидима. Приказани су резултати клиничке примене магнетне хипертермије и радиоактивног зрачења у терапији тумора, као и предности и недостаци ових појединачних терапијских приступа. Образложена је потреба за синтезом нових биокомпатибилних СМНЧ и испитивањем услова за њихово обележавање радионуклидом, који се користи у терапији, чиме би се добио мултифункционални терапијски агенс који дуалним ефектом магнетне хипертермије и радионуклидне терапије може имати велики потенцијал у терапији карцинома.

*Комисија сматра да увод и теоријски део пружају свеобухватан и савремен преглед проблематике којом се предметна дисертација бави. Добро је дефинисано подручје истраживања и прецизно су објашњене потребе за истраживањем.*

**Циљеви истраживања су :**

- Синтеза биокомпатибилних СМНЧ и испитивање услова за облагање синтетисаних СМНЧ АПТЕС-ом и ДМСА-ом.
- Одређивање специфичне апсорпције обложених СМНЧ-а и испитивање могућности њихове примене у магнетној хипертермији.
- Испитивање услова обележавања обложених СМНЧ јодом-131 индиректним методом, тј. испитивање ефикасности коњугације јодом-131 обележеног моноклонског антителя СС49 са обложеним СМНЧ.
- Испитивање биолошког понашања и ефекта дуалне терапије радиообележених СМНЧ на експерименталном животињском моделу (NOD-SCID мишеви са индукованим аденокарциномом колона).

***Комисија је мишљења да су циљеви истраживања добро формулисани, јасно изложени, повезани са предметом истраживања и у потпуности реализовани.***

**Радне хипотезе истраживања су:**

1. Применом одговарајуће методе синтезе СМНЧ и њиховим облагањем АПТЕС-ом и ДМСА-ом добијају се стабилне и биокомпатибилне СМНЧ.
2. Синтетисане обложене СМНЧ поседују особине које им омогућају примену у магнетној хипертермији.
3. Везивањем  $^{131}\text{I}$  за СМНЧ индиректно преко моноклонског антитела добијају се обележене СМНЧ стабилне *in vitro* и *in vivo*.
4. Обележене СМНЧ, када се примене на експерименталном животињском моделу са индукованим аденокарциномом колона, испољавају антитуморни ефекат путем дуалне радионуклидно-хипертермијске терапије тумора.

***Комисија закључује да је кандидат јасно и прецизно формулисао наведене хипотезе на задате циљеве истраживања, а очекивани резултати истраживања могу представљати значајан допринос науци.***

У поглављу **Експериментални део** детаљно су описане све методе и експерименти спроведени у склопу истраживања. Информације о методама синтезе и облагања СМНЧ на бази  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  као и о уређајима и методама за њихову физичко-хемијску карактеризацију наведене су детаљно, и омогућавају поновљивост истраживања. На врло јасан и размуљив начин су описане развијене технике обележавања моноклонског антитела СС49 са  $^{131}\text{I}$  и конјугације обележеног антитела са обложеним СМНЧ. Развијене методе за квантификацију и испитивање имунореактивности обележеног антитела, као и ефикасности конјугације су детаљно описане. Примењене методе за испитивање *in vivo* стабилности, биодистрибуције и ретенције  $^{131}\text{I}$ -СС49-СМНЧ, прикладне су за процену антитуморског ефеката хипертермије и радионуклидне терапије на имунодефицијентним (NOD-SCID) мишевима са индукованим аденокарциномом колона.

***Комисија констатије да су примењене методе истраживања описане јасно и систематично чиме се у потпуности омогућава поновљивост експеримената. Комисија сматра да је избор коришћених метода испитивања адекватан што обезбеђује добијање у потпуности поузданих и квалитетних резултата у складу са постављеним циљевима дисертације.***

Поглавље **Резултати и Дискусија** описује најважније резултате добијене у оквиру сваког појединачног циља истраживања. Резултати испитивања су прегледно и уверљиво приказани табеларно, графички и у виду оригиналне фотодокументације уз јасна пратећа текстуална тумачења.

Кандидат је аргументовано и критички дао појашњење и анализирао резултате сопствених истраживања, поредећи их са савременим, актуелним и релевантним наводима из других научних студија, које су обрађивале сличну или исту проблематику. Дискусија је обрађена јасно и аргументовано и током дискусије нису констатоване нелогичности.

***Комисија сматра да су изнети резултати оригинални, свеобухватни, јасно интерпретирани и да су приказани логичним редоследом на систематичан начин.***

***Дискусија добијених резултата је исцрпна, уверљива и научно утемељена, те указује на познавање проучаване проблематике уз критички осврт на савремену литературу. Кандидат је истакнуо сличности и разлике између резултата добијених у дисертацији и актуелних података из литературе.***

У поглављу **Закључак**, на основу добијених резултата и дискусије изведени су јасни, концизни, научно засновани и поуздани закључци.

*Комисија сматра да су закључци приказани на врло јасан и прецизан начин, прецизно формулисани, утемељени на представљеним резултатима истраживања и да произилазе из добро постављених циљева и примењене адекватне методологије.*

Литература садржи 300 релевантних литературних навода, који су цитирани према Ванкуверским правилима. Приказане референце су актуелне и у складу са темом ове дисертације.

*Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.*

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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у складу са *Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду* који је повезан са садржајем докторске дисертације. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду уредника часописа о томе.

**Stanković A**, Mihailović J, Mirković M, Radović M, Milanović Z, Ognjanović M, et al. Aminosilanzed flower-structured superparamagnetic iron oxide nanoparticles coupled to 131I-labeled CC49 antibody for combined radionuclide and hyperthermia therapy of cancer. *Int J Pharm.* 2020 Jul 15;587:119628. **M21**

**Stanković A**, Mirković M, Radović M. Radiolabeled Antibody-Coated Magnetic Nanoparticles: a Possible Therapeutic Approach. 8th Balkan Congress for Nuclear Medicine, 10-14. April 2019, Bodrum, Turkey. p 19. **M32**

**Stankovic A**, Mihailovic J, Mirkovic M, Radovic M, Jankovic D, Milanovic Z, Vranjes-Djuric S. Development of Radiolabeled Magnetite Nanoparticles for Possible Application in Cancer Therapy. 5th International Meeting on Molecular Imaging and Molecular Therapy "Updates in Nuclear Medicine – Diagnosis, Treatment & Beyond", 8-9. March 2019, Novi Sad, Serbia. p 43. **M34**

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

На основу добијених резултата истраживања изведени су следећи закључци:

1. СМНЧ на бази  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  су синтетисане методом копреципитације и полиол методом са приносом од  $\sim 70\%$  и  $\sim 32\%$ , редом, у циљу добијања СМНЧ-а одређеног облика, морфологије и магнетних особина. Наночестице добијене полиол методом су биле уједначених величина, добро дисперговане у води стварајући стабилан водени ферофлуид без агломерације, са бољим магнетним особинама у односу на наночестице синтетисане методом копреципитације ( $M_n=80 \text{ emu/g}^{-1}$  у односу на  $70 \text{ emu/g}^{-1}$ )
2. Облагањем СМНЧ АПТЕС-ом и ДМСА добијене су биокомпатибилне и стабилне суспензије – ферофлуиди са великим бројем функционалних група ( $-\text{NH}_2$  и  $-\text{COOH}$ ) на површини. ФТ-ИР спектроскопија је потврдила облагање тј. функционализацију површине СМНЧ АПТЕС-ом и ДМСА.
3. Применом магнетног поља јачине  $15.9 \text{ kA/m}$  и фреквенције од  $252 \text{ kHz}$  одређена је SPA вредност обложених СМНЧ, као мерило способности загревања. АПТЕС-СМНЧ имају бољу SPA вредност ( $123 \text{ W/g}$ ) у односу на ДМСА-СМНЧ ( $110 \text{ W/g}$ ) што је разлог зашто су се само оне користиле у наставку истраживања. Без обзира на употребљену већу фреквенцију магнетног поља у односу на клиничку употребу ( $100 \text{ kHz}$ ), SPA вредност АПТЕС-СМНЧ је упоредива са комерцијалним СМНЧ.
4. Оптимизацијом услова обележавања HSA, BSA, као и неспецифичног моноклонског антитела Hbe7 радионуклидом  $^{131}\text{I}$ , утврђено је да коришћењем хлорамина-Т у 3 пута већој маси у односу на протеин/антитело и Sephadex®-а G-25 као методе пречишћавања обележеног протеина/антитела добија се принос радиообележавања од  $\sim 60\%$  са високим вредностима радиохемиске чистоће ( $> 98\%$ ).
5. Коришћењем Брадфордвог теста и индиректне ЕЛИСА методе након оптимизованог обележавања CC49 мАт и пречишћавања коришћењем Sephadex®-а G-25, утврђено је да је укупно обележено  $311,5 \mu\text{g}$  од  $700 \mu\text{g}$  CC49 мАт у раствору P1 ( $16,058 \text{ MBq}/1140 \mu\text{L}$ ) и  $480 \mu\text{g}$  од  $860 \mu\text{g}$  CC49 мАт у раствору P2 ( $222 \text{ MBq}/1670 \mu\text{L}$ ) и да је  $^{131}\text{I}$ -CC49 мАт након оптимизованог обележавања задржао  $\sim 25\%$  своје имунореактивности.
6. Принос коњугације  $^{131}\text{I}$ -CC49 мАт са АПТЕС-СМНЧ карбодиимидном методом је износио  $\sim 86\%$  за раствор P1 и  $88\%$  за раствор P2. SDS-PAGE метода је доказала везу између карбоксилних група  $^{131}\text{I}$ -CC49 мАт-а са аминокиселинским групама на површини АПТЕС-СМНЧ. *In vitro* стабилност  $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ испитана је у физиолошком раствору и хуманом серуму на собној температури и до 8. дана од обележавања радиохемиска чистоћа била је  $> 90\%$ .
7. Испитивање биодистрибуције након и.в. инјектовања  $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ ( $370 \text{ kBq}/0,5 \text{ mg}$   $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ/ $0,05 \text{ mL}$  по мишу) NOD-SCID мишевима са индукованим туморима је показало да се ове обележене честице веома брзо уклањају из крви и акумулирају у јетри ( $56.39 \pm 3.15\%$  ИД/органу након 15 минута) док је акумулација у тумору  $< 0,56\%$  ИД/органу након 24 сата. Разлог томе је адсорбовање серумских протеина (стварање протеинске круне) и опсонина што доводи до препознавања и фагоцитозе  $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ од стране Купферових ћелија.
8. Испитивање ретенције након и.т. апликације  $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ ( $370 \text{ kBq}/0,5 \text{ mg}$   $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ/ $0,05 \text{ mL}$  по мишу) је показало да се коњугацијом  $^{131}\text{I}$ -CC49 мАт са АПТЕС-СМНЧ, ствара радиофармацеутик, који се својом величином ( $> 100 \text{ nm}$ ) и интеракцијом CC49 мАт са TAG-72 антигенима на аденокарциному колона, довољно дуго задржава у туморском ткиву да магнетне наночестице и радионуклид могу да испоље свој терапијски потенцијал. Недостатак и.т. инјектовања представљају инвазивност методе и немогућност приступа дубоко смештеним туморима.
9. Испитивање терапијског ефекта након и.т. примене  $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ ( $5,55 \text{ MBq}/0,5 \text{ mg}/0,05 \text{ mL}$ ) је показало да су радионуклидна терапија (РТ) и дуална терапија (МХТ+РТ) статистички значајно ( $p < 0,01$ ) инхибирале раст, док су статистички значајно мање масе тумора измерене само у групи МХТ+РТ у односу на обе контролне групе.
10. Одређивање инхибиције туморске запремине (ТВИР) је показало да је дуална терапија (МХТ+РТ)  $^{131}\text{I}$ -CC49-СМНЧ испољила највећу инхибицију туморског раста у односу на појединачне МХТ и РТ.

11. Поређењем са резултатима других истраживања,  $^{131}\text{I}$  је због ниске енергије зрачења погодан радионуклид за терапију тумора мање запремине (до  $80\text{ cm}^3$ ), док су за туморе са већом запремином неопходни радионуклиди већих енергија зрачења (нпр.  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  и др.).
12. Мања одступања у телесној маси од 20% код мерених мишева указује на безбедан токсиколошки профил  $^{131}\text{I}$ -СС49-СМНЧ, што је и потврђено микроскопским прегледом органа од интереса (срце, плућа, јетра, мозак, бубрези).
13. Патохистолошка испитивања тумора су показала да је највеће оштећење тумора и највећи степен туморске некрозе постигнут у МХТ+РТ групи, што потврђује велики терапијски потенцијал примењеног  $^{131}\text{I}$ -СС49-СМНЧ.

***Комисија сматра да су формулисани закључци логично изведени из добијених резултата и јасно приказују значај и научни допринос спроведеног истраживања.***

### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат Аљоша Станковић показао је систематичан научно-истраживачки приступ у анализи добијених резултата. Резултати су приказани прегледно и логичним редоследом, уз коришћење довољног броја графикана, табела и оригиналне фотодокументације. Подаци добијени у току истраживања обрађени су и анализирани помоћу адекватних статистичких метода. Добијени резултати су критички продискутовани и логички повезани са релевантним литературним подацима. Интерпретирани резултати и тумачења су повезани у целину са теоријским поставкама рада.

*Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачење резултата истраживања.*

### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Докторска дисертација је написана у потпуности у складу са предложеном методологијом истраживања, коју је кандидат навео у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Докторска дисертација је написана концизно и разумљиво, и садржи све битне елементе оригиналног научног рада.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Докторска дисертација по својој свеобухватности, добијеним резултатима и изнетим закључцима представља оригинални научни допринос у области радиофармације и нуклеарне медицине. Истраживања нових радиофармацеутика на бази СМНЧ обележених радионуклидима омогућавају нови приступ у терапији карцинома дуалним ефектом магнетне хипертермије и радионуклидне терапије. Сматра се да овај дуални ефекат може имати велики потенцијал у терапији карцинома.

У литератури не постоје подаци о условима оптимизације обележавања СМНЧ јодом-131, индиректно преко моноклонског антитела. Такође, дисертација указује на способност повећане акумулације и ретенције радиообележених СМНЧ у туморском ткиву уз статистички значајну инхибицију раста тумора услед ефекта дуалне хипертермијско-радионуклидне терапије. У дисертацији је такође доказан безбедносни токсиколошки профил овог новог радиофармацеутика као и да је радионуклид  $^{131}\text{I}$  погодан за терапију тумора мање запремине (до  $80\text{ cm}^3$ ), док за туморе са већом запремином су неопходни радионуклиди већих енергија зрачења. Добијени резултати отварају једно ново поглавље у истраживању могућности синтезе и карактеризације радиофармацеутика на бази СМНЧ и њихове улоге у терапију тумора, што ову дисертацију чини изузетно вредном.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

Докторска дисертација не садржи формалне нити суштинске недостатке који би могли утицати на резултате истраживања. Величина испитваног узорка је задовољавајућа, док је анализа података вршена адекватним статистичким методама. Аутор је направио осврт на могућа ограничења добијених резултата у дискусији и тиме показао непристрасност током тумачења.

<b>X ПРЕДЛОГ:</b>
На основу наведеног, комисија предлаже:
<b>а) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана;</b>
б) да се докторска дисертација врати кандидату на дораду (да се допуни односно измени);
в) да се докторска дисертација одбије.

Место и датум: Нови Сад, 09.07.2021. године

1. спец. др мед Радмила Жеравица,  
доцент

\_\_\_\_\_, председник

2. др Дрина Јанковић, научни саветник

\_\_\_\_\_, члан

3. др Жељко Пријовић, научни  
сарадник

\_\_\_\_\_, члан

**НАПОМЕНА:** Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.