

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У
БЕОГРАДУ**

Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

„ИСПИТИВАЊЕ ПРЕДНОСТИ ПРИМЕНЕ ПОЛИОКСОМЕТАЛАТА WELLS-DAWSON-ОВОГ ТИПА У
ТРАНСМИСИОНОЈ ЕЛЕКТРОНСКОЈ МИКРОСКОПИЈИ”

Кандидат: Др Александра Милосављевић

Одлуком Наставно научног већа Медицинског факултета у Београду од 08. 06. 2026. године, под бројем: **7/XVII-2/1-AM** именована је Комисија за оцenu научне заснованости теме докторске дисертације „ИСПИТИВАЊЕ ПРЕДНОСТИ ПРИМЕНЕ ПОЛИОКСОМЕТАЛАТА WELLS-DAWSON-ОВОГ ТИПА У ТРАНСМИСИОНОЈ ЕЛЕКТРОНСКОЈ МИКРОСКОПИЈИ” кандидата др Александре Милосављевић, у саставу:

Име и презиме члана комисије	Звање	Научна област	Установа у којој је запослен
др Тамара Кравић-Стевовић	Редовни професор	Хистологија и ембриологија	МФУБ
др Марко Стојановић	Ванредни професор	Фармакологија са токсикологијом	МФУБ
др Тамара Мартиновић	Доцент	Хистологија и ембриологија	МФУБ
др Мирјана Чоловић	Научни саветник	Биохемија	Институт за нуклеарне науке „Винча”-Институт од националног значаја за Републику Србију, УБ
др Татјана Парац-Вогт	Редовни професор	Бионеорганска хемија	KU Leuven, Department of Chemistry, Белгија

Име и презиме ментора	Звање	Научна област	Установа у којој је запослен
др Мила Ћетковић Милосављевић	Ванредни професор	Хистологија и ембриологија	МФУБ
др Данијела Крстић	Редовни професор	Хемија у медицини	МФУБ

На основу анализе приложене документације у вези са темом предложене докторске дисертације, након разговора са кандидатом, а према критеријумима за процену научне заснованости теме докторске дисертације, чланови Комисије подносе Наставно научно већу Медицинског факултета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Подаци о кандидату:

Александра Милосављевић, рођена је 28.08.1992. године у Крушевцу. Уписала је Медицински факултет Универзитета у Београду 2011. године. Дипломирала је 2017. године са просечном оценом током студирања 8,93. Од 2018. године је запослена на Институту за хистологију и ембриологију „Александар Ђ. Костић“ Медицинског факултета Универзитета у Београду. Специјалистичке академске студије из области микроскопије и ћелијске биологије уписала је 2017. године на Медицинском факултету у Београду, а завршила 2019. године одбравивши рад „Морфолошке и функционалне карактеристике сателитских глијалних ћелија у периферном нервном систему“. Докторске студије на смеру Молекуларна медицина уписала је 2019. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду, под менторством проф. др Миле Ћетковић Милисављевић и проф. др Данијеле Крстић. У периоду од 2020-2023. године, била је сарадник на пројекту у оквиру Програма сарадње српске науке са дијаспором; назив пројекта: *In vivo and in vitro evaluation of novel polyoxometalate based contrast for micro computed tomography*, финансираном од стране Фонда за науку Републике Србије; руководилац пројекта (PI): Проф. др Данијела Крстић; Project Partner из дијаспоре: Проф. др Татјана Парац-Вогт.

Б. Списак публикованих радова кандидата објављених у целини

1. **Milosavljević A**, Ćetković M, Kravić-Stevović T, Stojanović M, Čolović MB, Savić ND, Parac-Vogt TN, Krstić D. Hafnium-Substituted Wells–Dawson Polyoxometalate as a High-Performance Contrast Agent for Transmission Electron Microscopy of Biological Ultrastructure. *Int J Mol Sci*. 2026 Jun 18;27(12):5523.
2. Ćetković M, **Milosavljević A**, Boljanović J, Laketić D, Simić M, Bogosavljević N, Mirčić A, Milisavljević M. Micromorphological features of mastocytes in the trigeminal and human sympathetic superior cervical ganglions. *Medicinska istraživanja*. 2025; 58(2):117-123.
3. **Milosavljević A**, Ćetković M. Polyoxometalates: A new class of staining agents. *Medicinski podmladak*. 2025. Vol 76.br 6. DOI 10.5937/mp76-48955
4. Stojanović M, Čolović MB, Lalatović J, **Milosavljević A**, Savić ND, Declerck K, Radosavljević B, Ćetković M, Kravić-Stevović T, Parac-Vogt TN, Krstić D. Monolacunary Wells-Dawson Polyoxometalate as a Novel Contrast Agent for Computed Tomography: A Comprehensive Study on In Vivo Toxicity and Biodistribution. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 22;25(5):2569.
5. Stojanović M, Lalatović J, **Milosavljević A**, Savić N, Simms C, Radosavljević B, Ćetković M, Kravić Stevović T, Mrda D, Čolović MB, Parac-Vogt TN, Krstić D. *In vivo* toxicity evaluation of a polyoxotungstate nanocluster as a promising contrast agent for computed tomography. *Sci Rep*. 2023 Jun 5;13(1):9140.
6. Mirčić A, Maliković A, Štimec B, **Milosavljević A**, Ćetković D, Dožić A, Boljanović J, Đoković J, Ćetković M. Immunohistochemical analysis of the arterial supply and mast cells of the trigeminal ganglion. *Arch Biol Sci*. 2021;73(2):215-222.
7. **Milosavljević A**, Jančić J, Mirčić A, Dožić A, Boljanović J, Milisavljević M, Ćetković M. Morphological and functional characteristics of satellite glial cells in the peripheral nervous system. *Folia Morphol*. 2021;80(4):745-755.

Ц. ОБРАЗЛОЖЕЊЕ ТЕМЕ:

1. НАУЧНА ОБЛАСТ:

МЕДИЦИНА (ужа научна област: Молекуларна медицина)

2. ПРЕДМЕТ РАДА:

Предмет докторске дисертације ће бити испитивање могућности примене полиоксометалата (ПОМ) Wells–Dawson-овог (WD) типа као нових контрастних средстава у трансмисионој електронској микроскопији (ТЕМ). Истраживање ће бити усмерено на процену њихове способности да обезбеде квалитетан контраст и ултраструктуру биолошких узорака, као и на утврђивање оптималних услова њихове примене. Поред тога, биће извршено поређење са стандардним контрастним средствима која се користе у ТЕМ, као и процена применљивости полиоксометалата са најбољим контрастним перформансама у визуелизацији апоптотских промена на ћелијској култури НЕК (*Human Embryonic Kidney*) у *in vitro* условима.

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА:

1. Упоредити ефекте различитих полиоксометалата Wells–Dawson-овог типа: parent WD POM, lacunary WD POM, хафнијум-супституисаног (Hf-WD 1:2 POM) и цирконијум-супституисаног (Zr-WD 1:2 POM) полиоксометалата у контрастирању ћелијских и субцелуларних структура за потребе трансмисионе електронске микроскопије.
2. Проценити утицај различитих концентрација и различитих времена инкубације различитих полиоксометалата на квалитет контраста и ултраструктуру ткива.
3. Упоредити квалитет контраста ултратанких препарата добијених применом полиоксометалата са контрастом добијеним применом уранил-ацетата и комерцијалног препарата Uranyless.
4. Проценити могућност примене одабраног полиоксометалата као контраста у испитивању проапоптотског ефекта на ћелијској култури НЕК (*Human Embryonic Kidney*) у *in vitro* условима.

4. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА:

Полиоксометалати Wells–Dawson-овог типа, захваљујући својој високој електронској густини, структурној стабилности и способности интеракције са биолошким ткивима, могу представљати ефикасна и безбеднија контрастна средства за трансмисиону електронску микроскопију, са потенцијалом да дају квалитет контраста упоредив или супериоран у односу на стандардна контрастна средства, уз очуваност ултраструктуре и могућност примене у анализи ткивних исечака, као и ћелија третираних у *in vitro* условима.

5. МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА:

Истраживање је конципирано као експериментална лабораторијска студија. Узимање узорака бубрежног ткива експерименталних животиња биће обављено на Институту за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. Експерименти на ћелијској линији НЕК (*Human Embryonic Kidney*) биће изведени на Институту за биохемију и клиничку биохемију Медицинског факултета Универзитета у Београду. Припрема раствора ПОМ-ова биће спроведена на Институту за хемију у медицини Медицинског факултета Универзитета у Београду, док ће припрема узорака, анализа и евалуација добијених електронских фотомикрографија бити обављене на Институту за хистологију и ембриологију „Александар Ђ. Костић” Медицинског факултета Универзитета у Београду. Експерименти на животињама биће спроведени у складу са важећим етичким принципима и одобрењем Комисије за добробит експерименталних животиња.

У истраживању ће бити коришћени ултратанки исечци бубрежног ткива пацова *Wistar albino* соја, припремљени применом стандардних протокола за TEM. Након фиксације, постфиксације, дехидратације и калупљења у епокси смоли, биће припремљени ултратанки пресеци дебљине приближно 70 nm. За потребе целокупног истраживања биће коришћени ултратанки пресеци добијени од исте експерименталне животиње, чиме ће се обезбедити идентични експериментални услови и смањити биолошка варијабилност између јединки, у складу са принципом 3R.

Истраживање ће бити спроведено кроз три експерименталне фазе. У првој фази биће испитана ефикасност четири ПОМ-ова WD типа: parent WD POM ($[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$), lacunary WD POM ($(\alpha_2-[P_2W_{17}O_{61}]^{10-})$), Hf-WD 1:2 POM ($K_{16}[Hf(\alpha_2-P_2W_{17}O_{61})_2] \cdot 19H_2O$) и Zr-WD 1:2 POM ($K_{15}H[Zr(\alpha_2-P_2W_{17}O_{61})_2] \cdot 25H_2O$) као контрастних средстава за TEM. У другој фази биће испитан утицај различитих концентрација ПОМ-ова (0,01 mol/L и 0,001 mol/L), као и различитих времена инкубације (1 минут, 15 минута, 20 минута, 30 минута, 1 сат и 24 часа) на квалитет контраста и очуваност ултраструктуре. У трећој фази ПОМ који покаже најбоље контрастне карактеристике биће упоређен са стандардним контрастним средствима – уранил-ацетатом и комерцијалним препаратом *Uranyless*, коришћеним према упутству произвођача.

Након контрастирања, ултратанки пресеци постављени на бакарне мрежице биће анализирани трансмисионим електронским микроскопом Morgagni 268D (FEI, Hillsboro, OR) при убрзавајућем напону од 80 kV. Снимци ће бити регистровани 16-битном CCD камером са спорим скенирањем при номиналном увећању од 7,1kx. Квалитет TEM снимака биће процењиван на основу контраста, јасноће, резолуције и очуваности субћелијских структура. Јасноћа и резолуција биће процењиване на основу степена видљивости и разграничења мембрана, једра, хроматина и цитоплазматских органела, као и присуства или одсуства артефаката и замућења. Квалитативну процену снимака спровешће три независна искусна микроскопичара, применом методе слепог пробног, како би се елиминисала субјективност истраживача, док ће контраст бити квантитативно процењен анализом односа сигнал–шум (SNR- signal to noise ratio), применом ImageJ софтвера. За сваки контрастни третман биће анализирано по 10 TEM фотомикрографија.

У посебном делу истраживања биће коришћена ћелијска линија НЕК (*Human Embryonic Kidney*) као *in vitro* модел за испитивање применљивости ПОМ-а са најбољим контрастним перформансама у визуелизацији апоптотских промена. Ћелије ће бити узгајане у DMEM хранљивом медијуму обогаћеном феталним говећим серумом и антибиотицима, у стандардним условима ћелијске културе (37 °C, 5% CO₂). Биће формиране контролна и експериментална група, при чему ће у експерименталној групи апоптоза бити индукована применом колхицина. Након експерименталног третмана, ћелије ће бити сакупљене, припремљене за TEM и контрастиране ПОМ-ом који је у претходним фазама показао најбоље контрастне карактеристике. Анализираће се могућност његове примене у визуелизацији ултраструктурних промена карактеристичних за апоптозу, укључујући кондензацију хроматина, промене мембране нуклеуса, органела и формирање апоптотских тела.

Добијени резултати биће приказани применом метода дескриптивне статистике. Нормалност расподеле испитиваних параметара биће процењена одговарајућим тестовима, а за поређење група користиће се једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) са Tukey HSD *post hoc* тестом. Уколико расподела података не буде нормална, примениће се непараметарски Mann–Whitney U и Kruskal–Wallis тест. Повезаност испитиваних параметара биће анализирана Pearson-овим коефицијентом корелације. Статистичка обрада података биће извршена у програму GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA), при чему ће се статистички значајним сматрати вредности $p < 0,05$.

6. ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ:

Резултати овог истраживања требало би да покажу да ПОМови WD типа представљају ефикасна контрастна средства за примену у TEM. Очекује се да ће бити утврђене разлике у њиховој способности контрастирања и дефинисани оптимални услови примене у погледу концентрације и времена инкубације, што ће омогућити добијање TEM снимака високог квалитета уз добру очуваност ултраструктуре. Такође, резултати би требало да покажу да одабрани ПОМ даје квалитет контраста упоредив или супериоран у односу на стандардна контрастна средства и да има потенцијал за примену у визуелизацији ултраструктурних промена у експерименталним *in vitro* моделима. Добијени резултати могли би представљати основу за развој нових контрастних средстава за трансмисиону електронску микроскопију, која би, уз високу ефикасност контрастирања, могла да пружи већу безбедност примене и мању токсичност у односу на контрастна средства која су данас у употреби.

7. НАУЧНИ ДОПРИНОС:

Научни допринос предложене докторске дисертације огледа се у систематском испитивању могућности примене ПОмова WD типа као нових контрастних средстава у TEM. Истраживање представља једну од првих систематских студија усмерених на процену применљивости ове класе једињења за контрастирање биолошких узорака у TEM, што му даје значајан научни и методолошки допринос. Резултати истраживања омогућиће процену ефикасности различитих ПОмова WD типа, дефинисање оптималних услова њихове примене у погледу концентрације и времена инкубације, као и њихово поређење са стандардним контрастним средствима која се тренутно користе. Посебан допринос представљаће испитивање применљивости одабраног ПОМа у визуелизацији ултраструктурних промена на *in vitro* моделу апоптозе, чиме ће се проширити сазнања о могућностима његове примене у биомедицинским истраживањима. Добијени резултати могли би представљати основу за унапређење постојећих протокола контрастирања у TEM и допринети развоју нових контрастних средстава која би, уз задржавање високе ефикасности контрастирања, могла да обезбеде безбеднију примену и мању токсичност у односу на контрастне агенсе који су данас у широкој употреби.

8. СПИСАК КОРИШЋЕНЕ ЛИТЕРАТУРЕ:

1. Williams DB, Carter CB. *The transmission electron microscope*. Springer US; 2009.
2. Nakakoshi M, Nishioka H, Katayama E. New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2011;60(6):401–7.
3. Hosogi N, Nishioka H, Nakakoshi M. Evaluation of lanthanide salts as alternative stains to uranyl acetate. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2015;64(6):429–35.
4. Čolović MB, Lacković M, Lalatović J, Mougharbel AS, Kortz U, Krstić DZ. Polyoxometalates in biomedicine: update and overview. *Curr Med Chem*. 2020;27(3):362–79.
5. Vandebroek L, De Zitter E, Ly HG, Conić D, Mihaylov T, Sap A, Proost P, Pierloot K, Van Meervelt L, Parac-Vogt TN. Protein-assisted formation and stabilization of catalytically active polyoxometalate species. *Chem Eur J*. 2018;24(40):10099–108.
6. Roy S, Crans DC, Parac-Vogt TN. Polyoxometalates in catalysis, biology, energy and materials science. *Front Chem*. 2019;7:646.
7. Bijelic A, Aureliano M, Rompel A. The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chem Commun*. 2018;54(10):1153–69.
8. Yamase T. Anti-tumor, -viral, and -bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug. *J Mater Chem*. 2005;15(45):4773–82.
9. Kerckhofs G, Stegen S, van Gastel N, Sap A, Falgayrac G, Penel G, Durand M, Luyten FP, Geris L, Vandamme K, Parac-Vogt TN. Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure. *Biomaterials*. 2018;159:1–2.
10. Ma XQ, Xiao HP, Chen Y, Lai QS, Li XX, Zheng ST. Polyoxometalate-based macrocycles and their assembly. *Coord Chem Rev*. 2024;510:215818.
11. Nowicka D, Vadra N, Wiczorek-Szweda E, Patroniak V, Gorczyński A. Overview of Wells–Dawson polyoxometalates: from structure and functionalization to application. *Coord Chem Rev*. 2024;519:216091.
12. Rathee B, Wati M, Sindhu R, Sindhu S. Review of some applications of polyoxometalates. *Orient J Chem*. 2022;38(2):327–35.
13. Stojanović M, Lalatović J, Milosavljević A, Savić N, Simms C, Radosavljević B, Četković M, Kravić Stevović T, Mrda D, Čolović MB, Parac-Vogt TN, Krstić DZ. In vivo toxicity evaluation of a polyoxotungstate nanocluster as a promising contrast agent for computed tomography. *Sci Rep*. 2023;13:9140.
14. Stojanović M, Čolović MB, Lalatović J, Milosavljević A, Savić ND, Declerck K, Radosavljević B, Četković M, Kravić-Stevović T, Parac-Vogt TN, Krstić D. Monolacunary Wells–Dawson polyoxometalate as a novel contrast agent for computed tomography: a comprehensive study on in vivo toxicity and biodistribution. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5):2569.
15. Bhattacharjee R, Hare ET, Miro P. Structure, properties, and reactivity of polyoxocationic zirconium and hafnium clusters: a computational investigation. *Inorg Chem*. 2023;62(13):5081–7.
16. Li HL, Lian C, Yang GY. A Zr-added Dawson-type poly(polyoxometalate). *Dalton Trans*. 2023;52(4):857–61.
17. de Bournonville S, Vangrunderbeeck S, Ly HG, Geeroms C, De Borggraeve WM, Parac-Vogt TN, Kerckhofs G. Exploring polyoxometalates as non-destructive staining agents for contrast-enhanced microfocus computed tomography of biological tissues. *Acta Biomater*. 2020;105:253–62.

Д. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе приложене документације, чланови комисије сматрају да је предложена тема докторске дисертације „Испитивање предности примене полиоксометалата Wells-Dawson-овог типа у трансмисионој електронској микроскопији” кандидата др Александре Милосављевић значајна и актуелна и да у потпуности испуњава услове за оригиналан научни допринос у истраживањима која се односе на примену нових контрастних средстава за трансмисиону електронску микроскопију, као и на унапређење метода за визуелизацију ултраструктуре биолошких узорака. Предложено истраживање има потенцијал да пружи нова сазнања о примени полиоксометалата Wells-Dawson-овог типа као контрастних средстава у трансмисионој електронској микроскопији, дефинише оптималне услове њихове примене и процени њихову ефикасност у односу на стандардна контрастна средства. Добијени резултати могли би да допринесу развоју нових и безбеднијих контрастних средстава са мањом токсичношћу, чиме би се унапредиле постојеће методе електронске микроскопије и створила основа за њихову ширу примену у биомедицинским истраживањима.

Досадашњи стручни и научни рад кандидата др Александре Милосављевић, али и ментора 1, проф. др Миле Ћетковић Милосављевић и ментора 2, проф. др Данијеле Крстић, као и актуелност предложене теме, представљају реалну основу да ће истраживање бити извршено компетентно и на савремен начин.

Стога, на основу целокупне анализе приложеног материјала, Комисија једногласно закључује да су, поред законских, испуњени и сви остали формални услови и на основу тога предлаже Научном већу Медицинског факултета да кандидату др Александри Милосављевић одобри израду докторске дисертације са предложеном темом.

Комисија:

Београд, 06. 07. 2026. године

1. Проф. др Тамара Кравић-Стевовић

2. Проф. др Марко Стојановић

3. Доц. др Тамара Мартиновић

4. НСВ др Мирјана Чоловић

5. Проф. др Татјана Парац-Вогт