

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Наставно научног већа Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Одлуком Наставно научног већа Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, број 01-6596/3-3 од 10.07.2013 године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Милоша Арсенијевића под називом:

„Испитивање цитотоксичности комплекса злата и платине на ћелијским линијама аденокарцинома плућа *in vitro* и *in vivo*“

На основу одлуке Наставно научног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. **доц. др Владислав Воларевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. **проф. др Живадин Д. Бугарчић**, редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;
3. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Високе школе ВМА Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан;
4. **проф. др Слободан Милисављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хирургија, члан;
5. **доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно научног већу факултета Медицинских наука у Крагујевцу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Милош Арсенијевић**, испуњава све формалне услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Др мед. Милош Арсенијевић је рођен у Крагујевцу 1983. године. Завршио медицински факултет у Београду 2008. год. са просечном оценом 9,20. Уписао је докторске студије на Медицинском Факултету у Крагујевцу и положио све предвиђене испите као и усмени докторски испит.

Специјализант је грудне хирургије. Говори и пише енглески, служи се и италијанским језиком, познаје рад на рачунарима.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Испитивање цитотоксичности комплекса злата и платине на ћелијским линијама аденокарцинома плућа *in vitro* и *in vivo*“. Наслов докторске тезе је савремен и актуелан и одсликава главне циљеве истраживања.

Предмет: Испитати цитотоксичност деривата злата и платине у лабораторијским условима помоћу МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) теста и LDH (лактат дехидрогеназа) теста и *in vivo* испитивање на анималном моделу за метастазе аденокарцинома плућа.

Хипотеза: Очекује се да неки од испитиваних новосинтетисаних комплекса злата и платине покажу бољу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог адено-карцинома плућа (A549) *in vitro* и *in vivo* у поређењу са цисплатином.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат је објавио рад у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

M. Arsenijević, M. Milovanović, V. Volarević, A. Djeković, T. Kanjevac, N. Arsenijević, S. Đukić and ŽD. Bugarčić. Cytotoxicity of gold (III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. *Med Chem* 2012; 8(1):2-8(7). ISSN: 1573-4064 **M23 3 бода**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Ако се посматрају малигне болести, карцином плућа представља водећи узрок смрти мушкараца у свету а у целокупној популацији заузима друго место. Приближно се региструје око 1.2 милиона нових случајева годишње и 80-85% тумора плућа спада у групу не-ситно-ћелијског карцинома (енгл. *non small cell type, NSCLC*). Историјски гледано, хируршки приступ решавању овог проблема представља најбољу шансу већини пацијената за петогодишње преживљавање, али само 25%–30% NSCLC тумора је погодно за хируршку ресекцију. Уз адекватну хемиотерапију, преоперативно или постоперативно, петогодишње преживљавање је описано и код оболелих који се налазе у трећем или четвртном стадијуму болести. Од деведесетих година прошлог века као стандардна терапија у ове сврхе користи се комбинација деривата платине, а касније и комбинација деривата платине са аликилирајућим агенсима и антимераболитима фолата. У новије време се као прва терапијска мера за лечење локално одмаклих и метастатских стадијума

NSCLC користи комбинација цисплатине и пеметрексета (4), или пре било какве терапије пеметрексет самостално .

Цисплатина пролази ћелијску мембрану и у ћелији изазива апоптозу. Међутим, цисплатина неселективно индукује апоптотску смрт и туморских и здравих ћелија па је лечење тумора цисплатином повезано са бројним нежељеним ефектима и релативно брзим развојем резистенције. Уз то, резултати различитих комбинација хемиотерапеутика и даље нису задовољавајући, јер је проценат болесника са продуженим преживљавањем и даље врло мали. Преживљавање се у просеку повећава за 1.5 месец, а апсолутно продужење живота од годину дана је забележено код 10% оболелих.

Због тога су стално актуелна истраживања нових комплекса тешких метала која би имала сличан терапеутски ефекат као цисплатина а мање нежељених дејстава и слабији развој резистенције.

2.5. Значај и циљ истраживања

Обзиром да су карциноми плућа најчешћи узрок смрти од малигнитета у мушкараца и на другом месту по морталитету у жена, постоји стална потреба за налажењем нових терапеутских мера. Испитивањем новосинтетисаних комплекса на ћелијским линијама хуманог адено-карцинома плућа (A549) стекао би се научни основ за даље испитивање ових једињења. Такав комплекс би могао даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за лечење карцинома плућа. Ово истраживање има за циљ да испита цитотоксичност нових комплекса злата и платине на епителним ћелијама аденокарцинома плућа (ћелијске линије A549 и LLC1). Уколико неки комплекси покажу знатну цитотоксичност у поређењу са цисплатином и метротрексатом на који су LLC1 ћелије осетљиве, циљ је да се детаљније испита механизам дејства комплекса и да се утврде разлике у механизму изазивања смрти ћелија у односу на цисплатину. На мишјем моделу експерименталних метастаза тумора плућа провериће се који комплекси изазивају смрт туморских ћелија *in vivo* и који би комплекс могао даље да се испита као потенцијални терапеутик.

У пријављеној докторској тези јасно су постављени циљеви студије.

1. МТТ тестом испитати потенцијалну цитотоксичност комплекса.
2. Испитати релативни однос некротичне и апоптотске смрти ћелија изазване ипитиваним комплексима.
3. Испитати да ли комплекси утичу на смањење већ успостављених метастаза карцинома плућа у мишјем моделу.

2.6. Веза са досадашњим истраживањима:

Лечење тумора цисплатином је повезано са бројним нежељеним ефектима и релативно брзим развојем резистенције. Хемиотерапија NSCLC - (*non small cell type*) тумора плућа подразумева примену деривата платине самостално или у комбинацији са другим групама хемиотерапеутика као што су антимераболити фолата. Уз адекватну хемиотерапију, преоперативно или постоперативно, петогодишње преживљавање је описано и код оболелих који се налазе у трећем или четвртном стадијуму болести. Од деведесетих година прошлог века као стандардна терапија у ове сврхе користи се комбинација деривата платине, а касније и комбинација деривата платине са аликилирајућим агенсима и антимераболитима фолата

До данас испитивани платина (II) и платина (IV) комплекси, једињења злата (III) са полиаминима, полипиридинима, порфирином и дитиокарбамамом су показали *in vitro* цитотоксичност сличну или у неким случајевима већу у односу на цисплатину.

2.7. Методе истраживања

Ћелијске линије:

- **A549** (CCL-185, ATCC): хумани карцином плућа, NSCLC
- **LLC1** (CRL-1642, ATCC): мишји карцином плућа, NSCLC

In vitro испитивања

Вијабилност ћелија третираних комплекса ће се испитати МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) тестом. У метаболички активним ћелијама се МТТ редукује до љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија. А549 и LLC ћелије ће се излагати комплексима 24 и 72 сата, а испитаће се ефекти 8 различитих разблажења, свако разблажење ће се радити у трипликату.

Утицај комплекса на некрозу А549 и LLC ће се испитати LDH тестом. LDH је стабилни ензим присутан у цитоплазми ћелија који се убрзо по оштећењу плазма мембране отпушта у медијум у којем се ћелије гаје. Активност LDH ензима у супернатантима третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. А549 и LLC ћелије ће се излагати комплексима 24 сата, а испитаће се ефекти 8 различитих разблажења, свако разблажење ће се радити у трипликату.

Процент ћелија умрлих апоптозом након излагања комплексима испитаће се flow цитометријском анализом ћелија бојених Annexin-ом V и пропиридијум јодидом.

***In vivo* испитивање**

Да би се испитало да ли постоји корелација између резултата добијених у култури ћелија и ефеката у живом систему урадиће се *in vivo* испитивање на анималном моделу за метастазе аденокарцинома плућа.

Експерименталне животиње: C57BL/6 мужјаци узраста 6 до 10 недеља.

Индукција експерименталних метастаза тумора плућа: мишевима ће се интравенски апликовати 5×10^5 LLC1 ћелија у репну вену. Мишеви ће бити подељени у 3 експерименталне групе и 1 контролну групу, а сваку групу чиниће 25 мишева.

Снага студије и одређивање величине узорка (групе): Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима броја метастаза на површини плућа, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. С обзиром да је за број метастаза нађена најмања разлика између експерименталне и контролних група, ова вредност је коришћена за израчунавање величине узорка. Разлика у вредностима броја метастаза између контролне групе и испитиваних група износи 3, а да је стандардна девијација такође 3 утврђени број експерименталних животиња према групама износи 17 за сваку од група, али користићемо по 25 мишева у свакој групи. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 13.

I експериментална група: мишеви ће 1. дана експеримента примити интравенски 5×10^5 LLC1 ћелија у репну вену

II експериментална група: почевши од 10. дана након апликације туморских ћелија, мишевима ће три пута недељно бити апликован комплекс платине или злата које је показало најбољу цитотоксичност *in vitro*.

III експериментална група: почевши од 10. дана након апликације туморских ћелија, мишевима ће три пута недељно бити апликован комплекс цисплатине.

Контролна група: мишеви ће од 1. дана експеримента примати интравенски физиолошки раствор

Све супстанце мишеви ће примати 3 пута недељно а дозе ће бити одређене на *основу in vitro* испитивања.

Пратиће се преживљавање по групама. Мишеви ће се жртвовати 21. дана експеримента (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измењено понашање)

Хистолошка анализа:

Након жртвовања мишевима ће се извадити плућа, медијастинални лимфни чворови, јетра, слезина и десни бубрег од којих ће се правити парафински исечци и бојити хематоксилин/еозином. Одређиваће се присуство и број метстазау паренхиму плућа и упоређиваће се број метстаза по групама. Такође испитаће се постојање оштећења ткива јетре и бубрега, како у смислу секундарних депозита, тако и у смислу оштећења насталих дејством комплекса.

Врста студије

Експериментална студија

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13.

Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користиће се параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације:

Обзиром да су карциноми плућа најчешћи узрок смрти од малигнитета у мушкараца и на другом месту по морталитету у жена, постоји стална потреба за налажењем нових терапеутских мера.

Очекује се да испитивање новосинтетисаних комплекса на ћелијским линијама адено-карцинома плућа да основ за даље испитивање ових једињења у хемиотерапији

Испитивањем новосинтетисаних комплекса на ћелијским линијама хуманог адено-карцинома плућа (A549) стекао би се научни основ за даље испитивање ових једињења. Такав комплекс би могао даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за лечење карцинома плућа

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овој докторској дисертацији биће описана новосинтетисана једињења комплекса злата и платине, *a in vitro* и *in vivo* методама биће испитана њихова цитотоксичност на ћелијским

линијама аденокарцинома плућа. *In vitro* методе ће испитати цитотоксичност деривата злата и платине у лабораторијским условима помоћу МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) теста и LDH (лактат дехидрогеназа) теста, а *in vivo* испитивање ће бити спроведено на анималном моделу за метастазе аденокарцинома плућа. Експерименталне животиње ће бити C57BL/6 мишеви, мужјаци узраста 6 до 10 недеља којима ће се интравенски апликовати 5×10^5 LLC1 ћелија у репну вену.

Очекује се да неки од испитиваних новосинтетисаних комплекса злата и платине који покаже знатно бољу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог адено-карцинома плућа, у поређењу са цисплатином, буде и даље испитиван као потенцијални терапеутик за лечење карцинома плућа.

2.10. Предлог ментора:

За ментора се предлаже доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија који је са кандидатом урадио пробно истраживање на ову тему публиковано у међународном часопису M23 категорије: М. Arsenijević, М. Milovanović, V. Volarević, A. Djeković, T. Kanjevac, N. Arsenijević, S. Đukić and ŽD. Bugarčić. Cytotoxicity of gold (III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. Med Chem 2012; 8(1):2-8.

2.11. Научна област дисертације

Медицина, Ужа научна област: хирургија

2.12. Научна област чланова комисије

Научна област чланова комисије одговара теми докторске дисертације.

1. доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. проф. др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;
3. проф. др Данило Војводић, редовни професор Високе школе ВМА Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан;
4. проф. др Слободан Милисављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хирургија, члан;
5. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Закључак и предлог комисије

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др мед Милоша Арсенијевића под називом: „Испитивање цитотоксичности комплекса злата и платине на ћелијским линијама аденокарцинома плућа *in vitro* и *in vivo*” и одобри њену израду.

1. доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;

2. проф. др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;

3. проф. др Данило Војводић, редовни професор Високе школе ВМА Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан;

4. проф. др Слободан Миљисављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хирургија, члан;

5. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

У Крагујевцу, 11.07.2013 године