

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Број:	23.12.19
Датум:	
05	16627/1-1

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-910/39 од 13.11.2019. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Саше Беназић, под називом:

"Citotoksičnost kompleksa cinka(II) u modelu karcinoma dojke miša"

Чланови Комисије су:

1. **проф. др Гордана П. Радић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија; председник;
2. **проф. др Јелена Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. **доц. др Јелена Пољаревић**, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганичка хемија, члан;
4. **проф. др Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Птолошка анатомија, члан;
5. **проф. др Срђан Нинковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Саша Беназић је рођена 04.02.1965. године. Основну и средњу школу (сарадник у настави биологија-хемија) је завршила у Ријечи. Медицински факултет у Ријечи је уписала 1983. године а дипломирала је 1989. године. Као доктор медицине ради од 1989. године. У Одјелу за трансфузијску медицину ОБ Пула је запослена 1991. године. Године 1996. је завршила специјализацију из трансфузијске медицине, а од 2002. године је руководилац Одјела за трансфузијску медицину ОБ Пула. Истовремено је руководилац Лабораторије за имунохематологију и Јединице за издавање крвних припревака. Од 2002. године истиче се њен значајан допринос у унапређењу рада наведеног Одјела а који се огледа у информатизацији и аутоматизацији обраде и тестирања, производњи крвних припревака и увођењу осигурања квалитета. Због тога је Одјел константно опреман новим апаратима (аутоматским коагулометрима, имунохематолошким апаратима за аутоматско одвајање крвних припревака, апаратима за стерилно преспајање цијевчица, леденицама и хладњацама за чување крвних припревака, као и информатичком опремом (од стране болнице и донацијама). Председник је Повјеренства за трансфузијско лијечење ОБ Пула и

члан Повјеренства за реорганизацију трансфузијске службе Републике Хрватске. Похађа Докторске студије из биомедицине у склопу ЕСПД и Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: "Citotoksičnost kompleksa cinka(II) u modelu karcinoma dojke miša"

Предмет: Истраживањем је планирано испитивање ефеката новосинтетисаних комплекса цинка са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине на раст карцинома дојке миша, као и да се утврђивање потенцијалних механизма њихове антигуморске активности на ћелијским линијама хуманог и мишјег порекла.

Хипотеза: новосинтетисани комплекси цинка, у поређењу са цисплатином показују израженији антигуморски ефект *in vitro* на 4Т1 ћелијама и *in vivo* у експерименталном моделу карцинома дојке.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је публиковао један рад у целини за штампу у часопису са CC/SCI листе, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

S. Benazic, Z. Besser Silconi, J. Milovanovic, A. Arsenijevic, B. Stojanovic, M. Milovanovic, T. Kanjevac. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (1): 55-60 **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Упркос значајном напретку у лечењу, карцином дојке је и даље један од водећих узрока смрти жена у свету. Бројни нежељени ефекти и резистенција на цитостатике представљају главну препреку у лечењу карцинома дојке, због чега постоји стална потреба за дизајнирањем нових потенцијалних терапеутика. Стога су комплекси прелазних метала као што су: бакар, цинк и кобалт предмет новијих истраживања чији резултати указују да ова једињења представљају атрактивне антиканцерске терапеутике којима би се потенцијално редуковали нежељени ефекти примене комплекса платине.

Цинк је, као прелазни метал, један од најважнијих испитиваних елемената претежно због његове биокомпатибилности у живим системима. Укључен је у регулацију кључних реакција у ћелији као што су одговор на оксидативни стрес, репликација и поправка ДНК, трансдукција сигнала, ћелијски циклус и апоптоза.

2.5. Значај и циљ истраживања

Основни циљ истраживања је да се испитају ефекти новосинтетисаних комплекса цинка са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине на раст карцинома дојке миша, као и да се утврде потенцијални механизми њихове антигуморске активности на ћелијским линијама хуманог и мишјег порекла.

У складу са циљем постављени су следећи **експериментални задаци**:

1. одредити цитотоксичку активност комплекса цинка(II) на линијама туморских ћелија хуманог и мишјег порекла
2. утврдити ефекат селектованих комплекса цинка(II) на раст мишјег карцинома дојке праћењем динамике раста и одређивањем масе тумора
3. испитати евентуалне нежељене ефекте (хепато- и нефро- токсичност) испитиваних комплекса
4. анализирати ћелијски циклус, као и експресију молекула укључених у регулацију у туморским ћелијама третираних са комплексима цинка(II)
5. испитати молекулске механизме проапоптотске активности комплекса цинка(II) у туморским ћелијама.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У доступној литератури описано је више различитих комплекса цинка који поред антимикробног и антиинфламацијског, показују и антитуморско деловање. Циљање апоптозе и ћелијског циклуса у туморској ћелији су атрактивна стратегија за успешно лечење тумора. У овом контексту, показано је да комплекс *mezo-Zn(II)* инхибира пролиферацију ћелија и индукује апоптозу MCF7 варијанте карцинома дојке људи *in vitro* (10). Комплекси Zn(II) са 5,7-дихало-супституисаним-8-квинолинолином узрокују смрт туморских ћелија тако што у њима заустављају ћелијски циклус у S фази и покрећу митохондријски пут активације апоптозе. Уз наведено, показано је да ови комплекси цинка(II) супримирају експресију мутиране форме молекула p53. Апоптотска активност комплекса кверцетин цинк(II) у тумору је вероватно повезана са њиховом интеркализацијом у молекул ДНК. Такође, комплекси цинка(II) са потентним инхибиторима киназа које зависе од циклина, добијених из 6-бензиламинопурина, инхибирају комплекс CDK 2 (енгл. *Cyclin-Dependent Kinase 2*) и циклина E, што резултује заустављањем ћелијског циклуса и/или апоптозом. Међутим, туморицидни ефекат ових различитих комплекса цинка(II) на раст тумора *in vivo* није испитивана.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија на животињама, *in vitro* и *in vivo*.

Линије туморских ћелија

У студији ће се користити линије туморских ћелија, 4T1 (ATCC® CRL-2539™), MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132), BCL1 (ATCC® TIB-197) и JVM-13 (ATCC® CRL-3003™) а оне ће се узгајати у стандардним условима. У свим појединачним експериментима користиће се само она ћелијска суспензија која садржи ≥95% вијабилних туморских ћелија, а чија ће се вијабилност одредити помоћу боје trypan-blue.

Тестови за евалуацију цитотоксичности комплекса цинка(II)

MTT тест: Туморске ћелије ($5 \cdot 10^4$ ћелија/ml), претходно излагане испитиваним комплексима у различитим временским интервалима и у различитим концентрацијама, инкубираће се у раствору MTT 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid).

Оптичка густина (encl. *Optical Density*, OD) ће се одредити на таласној дужини од 595nm на уређају Microplate multimode detector, Zenyth 3100.

Процент вијабилних ћелија ће се израчунати према формули:

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

Е-станице третиране испитиваним тварима (комплекс цинка(II) или цисплатина) (апсорбанца); Б- контрола-бленк (апсорбанца); К- нетретиране станице (апсорбанца).

LDH тест: Када је ћелијска мембрана на било који начин компромитована или оштећена, лактат дехидрогеназа (енгл. *Lactate DeHydrogenase*), присутна у цитоплазми сваке живе ћелије, се ослобађа у ванћелијски простор. Пошто се то дешава само када је интегритет ћелијске мембране нарушен, присуство овог ензима у медијуму, у коме се станице узгајају *in vitro*, може да буде показатељ ћелијске смрти. LDH цитотоксички тест је колориметријска метода која се заснива на мерењу активности ензима LDH ослобођеног након оштећења ћелије. Активност овог ензима у супернатанту третираних ћелија расте с порастом броја мртвих или оштећених ћелија. У супернатанту туморских ћелија које су претходно третиране испитиваним комплексима додаће се по 100µl радног раствора LDH кита In Vitro Toxicology Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Након инкубације, у трајању од 30 минута у мраку на собној температури, одредиће се оптичка густина на уређају Microplate multimode detector, Zenyth 3100.

Процент мртвих ћелија ће се израчунати према формули:

$$\% \text{ мртвих ћелија} = (E-B) / ((T-B) - (K-B)) \times 100$$

Е-ћелије третиране са тестираним комплексима или цисплатином (апсорбанца); Б- активност ензима у медијуму (апсорбанца); Т-ћелије третиране са тритоном X (апсорбанца); К- нетретиране ћелије (апсорбанца).

Лабораторијске животиње

Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја BALB/C женског пола, старости од 8 до 10 недеља. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огулних животиња, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (01-8670, 17.07.2019). Све експерименталне и контролне групе садржаће по 20 мишева.

Након појаве палпабилног тумора, мишеви соја BALB/C ће се методом случајног узорка распоредити у следеће групе:

I група: мишеви са карциномом дојке којима ће се апликовати селектовани комплекс цинка(II)

II група: мишеви са карциномом дојке којима ће се апликовати цисплатина

III група: мишеви са карциномом дојке којима ће се апликовати физиолошки раствор

Ортогипски модел карцинома дојке и фармаколошки третман мишева

Карцином дојке ће се имплантирати убризгавањем малигних ћелија 4T1. Туморске ћелије ће се апликовати субкутано у дози 5×10^4 у 50µL медијума, у 4. млечну жлезду сингених BALB/C мишева. Раст палпабилног примарног тумора пратиће се свакодневно уз истовремено морфометријско одређивање његовог волумена.

Волумен тумора се израчунава по формули:

$$V (\text{mm}^3) = L (\text{већи пречник}) \times W (\text{мањи пречник}) / 2.$$

Када величина примарног тумора достигне величину 2mm³ мишеви ће се третирати са испитиваним комплексима, а контролним мишевима ће се интраперитонеално апликовати цисплатина и физиолошки раствор, 2 пута недељно, 30 дана. Дозе комплекса које ће се

користити за примену *in vivo* израчунаће се на темељу добијених вредности цитотоксичности *in vitro*. Мишеви ће бити жртвовани 30. дана од убризгавања туморских ћелија.

Испитивање токсичности комплекса

У серуму ће се одредити концентрација ензима AST и ALT чији пораст може указати на евентуалну хепатотоксичност, као и креатинина односно показатеља нефротоксичности.

Процена апоптотског ефекта испитиваних комплекса

Квантитативно испитивање апоптотске смрти: проточном цитометријом анализираће се процентуална заступљеност 4T1 туморских ћелија обојених *Annexin*-ом V и пропиридијум јодидом (PI) након третмана са комплексима цинка(II).

TUNEL методом ће се анализирати проценат апоптотичних туморских ћелија у исечцима ткива примарног тумора након претходно описаног третмана мишева.

Анализа експресије молекула укључених у регулацију апоптозе помоћу методе RT-PCR: Укупна информациона РНК (иРНК) естраховаће се из 4T1 ћелија третираних са комплексом цинка(II), као и из нетретираних туморских ћелија. Коришћењем одговарајућих прајмера испитиваће се експресија иРНА за синтезу каспазе 3, Bcl-2 и Вах.

Анализа ћелијског циклуса након третмана са комплексом цинка(II)

Ћелије ће се обојити PI у присуству 0.5 mg/ml RNA-азе у трајању од 30 минута, у мраку на собној температури. Проточном цитометријом анализираће се дистрибуција ДНК и одредиће се профил ћелијског циклуса третираних туморских ћелија.

Процена антипролиферативне способности ћелија: Након третмана 4T1 ћелија са комплексима цинка(II) проточном цитометријом ће се одредити проценат ћелија које исказују циклине и инхибиторе комплекса циклина и циклин зависних киназа.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је на основу података о величини тумора публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student's t* према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 20 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's t* тест за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе животиња, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата користиће се комерцијални програмски пакет SPSS 18.

Статистичка обрада података

Добивени резултати бити ће представљени као средње вриједности \pm стандардне грешке. Статистичка значајност ће се одређивати *Student*-овим *t* тестом и ANOVA тестом за узорке који имају нормалну расподелу и *Mann-Whitney* и *Kruskal Wallis* тестом за узорке који немају нормалну расподелу. Статистичка значајност бити ће претпостављена за $p < 0.05$. Све статистичке анализе бити ће обављене употребом програма SPSS 18.0.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да новосинтетисани комплекси инхибирају раст мишјег карцинома дојке (4T1). Потенцијални механизми одговорни за овај антитуморски ефект су индукција апоптозе и инхибиција ћелијског циклуса. Овим истраживањем би се расветлила могућност да новосинтетисани комплекси цинка са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине постану потенцијални кандидати у експерименталној терапији тумора.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Комплекси прелазних метала привлаче све већу пажњу као потенцијални кандидати у лечењу тумора. Цинк је, као прелазни метал, један од најважнијих испитиваних елемената претежно због његове биокомпатибилности у живим системима. Циљ овог истраживања је да се испита ефекат новосинтетисаних комплекса цинка са одређеним S-алкил дериватима тиосалицилне киселине на раст карцинома дојке миша, као и да расветле потенцијални механизми који су у основи њихове антитуморске активности.

Цитотоксичка активност комплекса цинка(II) на више линија туморских ћелија биће испитана *in vitro* MTT и LDH тестовима на ћелијским линијама хуманог и мишјег порекла. Примарни тумор ће се имплантирати тако што ће се ћелије мишје линије 4T1 инокулисати ортотопски у млечну жлезду сингених BALB/C мишева. Након појаве палпабилног тумора, једна група мишева биће подвргнута третману комплексом цинка(II) селектованим на основу резултата претходне *in vitro* студије. Као референтни цитостатик користиће се цисплатина. Пратиће се динамика раста тумора и маса тумора. Проточном цитометријом и RT-PCR методом испитаће се ефекат комплекса цинка(II) на апоптозу и ћелијски циклус 4T1 ћелија.

Овим истраживањем би се проверила могућност да ли новосинтетисани комплекси цинка са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине могу да постану потенцијални кандидати за експерименталну терапију тумора.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **проф. др Гордану Радосављевић**, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија. проф. др Гордана Радосављевић испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9.

3.1. Компетентност ментора

Релевантне референце које су из области теме докторске дисертације:

1. **Radosavljevic G**, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Juranic Lisnic V, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28(5):451-462.
2. **Radosavljevic G**, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res* 2012; 52(1-2):100-110.

3. Jovanovic I, Pejnovic N, **Radosavljevic G**, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. *Int J Cancer* 2014; 134(7):1669-1682.
4. Jovanovic I, **Radosavljevic G**, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur J Immunol* 2011; 41(7):1902-1912.
5. Jovanovic IP, Pejnovic NN, **Radosavljevic GD**, Arsenijevic NN, Lukic ML. IL-33/ST2 Axis in Innate and Acquired Immunity to Tumors. *OncoImmunology* 2012; 2012; 1(2):229-231.

4. Научна област дисертације

Медицина.

5. Научна област чланова комисије

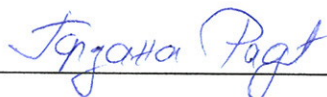
1. проф. др **Гордана П. Радић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија; председник;
2. проф. др **Јелена Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. доц. др **Јелена Пољаревић**, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;
4. проф. др **Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Птолошка анатомија, члан;
5. проф. др **Срђан Нинковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада, кандидат др мед. Саша Беназић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Саше Беназић, под називом „**Citotoksičnost kompleksa cinka(II) u modelu karcinoma dojke miša**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

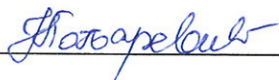
проф. др Гордана П. Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија; председник;



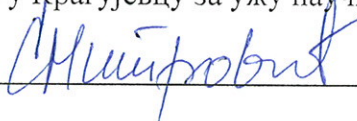
проф. др Јелена Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;



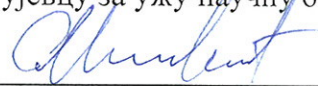
доц. др Јелена Пољаревић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;



проф. др Слободанка Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Птолошка анатомија, члан;



проф. др Срђан Нинковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан.



У Крагујевцу, 02. 12. 2019.