

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-268/59, од 13. 04. 2016. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Žane Besser Silconi, под називом:

"Citotoksičnost kompleksa platine u mišjem modelu kronične limfocitne leukemije"

Чланови Комисије су:

1. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, председник
2. **Доц. др Гордана Радић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
3. **Доц. др Јелена Пантић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
4. **Проф. др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска статистика и информатика, члан
5. **Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, 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

Žana Besser Silconi је рођена 18.08.1967. године. Основну и средњу школу је завршила у Зеници. Медицински факултет у Ријечи је уписала 1986. године а дипломирала је 1992. године. Као доктор медицине ради од 1993. године. Године 2001. је завршила специјализацију из клиничке цитологије, а од 2012. године је руководилац Одјела за клиничку цитологију ОБ Пула. Члан је лекарске коморе Хрватске и Хрватског друштва за клиничку цитологију. 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 platine u mišjem modelu kronične limfocitne leukemije"

Предмет: Свака терапијска мјера за CLL (CLL od eng. *Chronic Lymphocytic Leukemia*) праћена је развојем резистенције па би лијекови који имају цитотоксичну активност и инхибирају активацију и посљедичну пролиферацију CLL станица, могли да буду корисни у лијечењу.

Хипотеза: Новосинтетизирани комплекси платине, у упоредби с цисплатином и стандардним лијековима (алкилирајући агенси) који се користе за лијечење CLL флударабином и циклофосфамидом, испољавају израженији антитуморски ефект ин витро на BCL-1 станицама и ин виво у експерименталном моделу CLL.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је публиковао више радова у часописима међународног и националног значаја, од чега један рад као први аутор чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

Релевантна референца:

Ž. Besser Silconi, S. Benazic, J. Milovanovic, A. Arsenijevic, B. Stojanovic, M. Milovanovic, T. Kanjevac. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16 (3): 181-186. **M52**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

B-CLL је честа, углавном хетерогена болест коју карактеризира прогресивна акумулација малигно трансформисаних В лимфоцита у коштаном сржи, крви и другим органима, што за последицу има бројне компликације као што су рекурентне инфекције и аутоимунски поремећаји. Дуго се сматрало да је CLL резултат клонске акумулације малигно трансформираних зрелих В лимфоцита који су резистентни на апоптозу, иако ову карактеристику губе по изолацији из организма, што указује да на биологију CLL станица директно утјечу фактори из окружења и/или интеракције адхезивних молекула. Већина CLL станица у периферној крви је у G0/G1 фази станичног циклуса и експримира гене карактеристичне за зреле В лимфоците. Новије студије биологије ове болести указују да постоји значајна пролиферација CLL станица и да је интензивнија стопа пролиферације удружена с агресивнијим обликом болести. Испитивања станица изолираних из крви, коштане сржи и лимфних чворова су показала да су пролиферирајуће CLL станице присутне углавном у лимфним чворовима указујући да се активација и клонска експанзија ових станица дешава у секундарним лимфним органима гдје многобројне интеракције станица с антигенима и молекулама из микроокружења доприносе преживљавању и пролиферацији В лимфоцита. У периферној крви се поред туморских станица које слабо пролиферирају налазе и други клонови туморских станица који су претходно активирани антигеном. CLL станице, изолиране из периферне крви, затим ин витро стимулиране факторима који имитирају природно микроокружење задржавају способност поновне пролиферације. CLL станице рециркулирају између периферне крви и лимфних органа, пролазе кроз циклусе слабе пролиферације и мировања на периферији до реактивације и клонске експанзије у лимфним органима. У складу с налазом да се јавља циклична стимулација CLL станица која доприноси гомилању цитогенетских абнормалности и прогресији CLL. У CLL станицама је детектирана смањена експресија p53 гена и других

проапоптотских протеина, BAD и PKR, уз истовремено повећану активност сигналних путева који стимулирају преживљавање а укључују BCR, NFκB, PIP3K, ZAP-70 и BTK.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области
Основни циљ овог истраживања је да се утврди потенцијални анитуморски ефект новосинтетизираних комплекса платине ин витро кориштењем BCL-1 станичне линије ЦЈЛ миша и *in vivo* кориштењем експерименталног модела CLL.

У складу с основним циљем постављени су и сљедећи експериментални задаци:

- Утврдити цитотоксичну активност комплекса на BCL-1 станичној линији.
- Испитати утјецај комплекса платине на станични циклус и митотску активност станица BCL-1 станичне линије.
- Испитати утјецај комплекса платине на експресију адхезивних и хоминг молекула на BCL-1 станицама стимулираних липополисахаридом, као и на станицама изолованим из мишева с индуцираном CLL.
- Испитати утјецај комплекса платине на активност сигналних путева PI3/Akt и NF-κB/STAT3 који регулирају прогресију станичног циклуса у BCL-1 станицама и који играју важну улогу у патогенези CLL.
- Испитати дјеловање комплекса платине ин виво на анималном моделу CLL код сингених BALB/c мишева и то интравенском апликацијом BCL1 станичне линије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Цисплатина испољава биолошки ефект везивањем за DNA и протеине те инхибира транскрипцију и DNA репликацију што резултира апоптозом и/или некрозом станица па се користи за лијечење различитих тумора. Терапијска примјена цисплатине је повезана с појавом озбиљних нежељених дејстава, али и честим развојем резистенције. Друга генерација аналога цисплатине, оксалиплатин и сатраплатин, испољавају блажу хепато- и нефро-токсичност у упоредби с цисплатином па су и даље актуални покушаји добивања ефикаснијих, али мање токсичних комплекса платине. У скорије вријеме показано је да цисплатина редуцира активност протеина укључених у провођење сигнала с BCR-а и на тај начин регулира пролиферацију станица. С обзиром да CLL станице развијају резистенцију на све до сада кориштене кемотерапеутике и да новији приступи лијечења CLL подразумијевају примјену модулятора сигналних молекула испитали бисмо потенцијални цитотоксични или цитостатски ефект новосинтетизираних комплекса платине ин витро на станицама кроничне лимфоцитне леукемије миша BCL-1 и анитуморски ефект *in vivo* у експерименталном моделу CLL.

2.7. Методе истраживања

Врста студије: Експериментална студија.

Станична култура и испитиване супстанце: BCL-1 станична линија (ATCC® TIB-197™) ће се узгајати у стандардним условима (RPMI1640 медијум с 2 mM L-глутамином, 0.05 mM 2-меркаптоетанола и 15% феталног говеђег серума). За испитивање ин витро ефеката комплекса на BCL-1 станичној линији користит ће се стандардно узгојене BCL-1 станице и

BCL-1 станице стимулиране липополисахаридом (1 μ g/ml). Испитиват ће се ефекти новосинтетизираних комплекса платине добијених са Института за хемију, Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Као контролне супстанце користит ће се цисплатина [PtCl₂ (NH₃)₂] и лијекови који се стандардно користе за лијечење CLL флударабин и циклофосфамид. Као контролне станице користит ће се В лимфоцити изолирани магнетном сепарацијом из периферне крви BALB/c мишева.

Експерименталне животиње: Као експерименталне животиње користит ћемо мишеве соја BALB/c мушког пола, старости од 8 до 10 тједана. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Тестови цитотоксичности и митотске активности:

МТТ тест за испитивање цитотоксичног ефекта: CLL станице (106 станица/ml) претходно излагане испитиваним супстанцама у различитим временским интервалима и концентрацијама ће се излагати МТТ супстанци 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid у трајању од 4 сата у микротитар плочама с 96 отвора. Интензитет боје у станицама се одређује колориметријски и интензитет боје је пропорционалан броју живих станица.

Процена пролиферативне способности: анализа проточном цитометријом станица фиксираних 90% етанолом и обојених KI67 mAb коњугираним FITC-ом.

Квантитативно испитивање апоптотске смрти: анализа проточном цитометријом третираних станица бојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом (PI).

Анализа станичног циклуса: станице бојене 30 μ g/ml PI у присуству 0.5 mg/ml RNase у трајању од 30 минута у мраку на собној температуре ће се користити за анализу дистрибуције DNA и анализу станичног циклуса.

Анализа експресије протеина проточном цитометријом: третиране станице BCL-1 станичне линије, као и станице изолиране из крви, лимфних чворова и слезене мишева којима је индуцирана болест ће се бојити антитијелима специфичним за мембранске молекуле: CD44, CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), CD62L i CXCR4(CD184), као и за интрацелуларне молекуле Mcl-1, Bcl-1, Noxa1, ciklin D3, ciklin E, ciklin A, Akt, STAT3, pSTAT3(Tyr705), pSTAT3(Ser727), pAkt(Ser473), pNFkB(Ser536). Обиљежене станице ће бити анализирани помоћу FACSCalibur проточног цитометра (BD Biosciences), а анализа обављена употребом програма FlowJo (Tree Star).

Експериментални модел CLL и примјена испитиваних супстанци: станице кроничне лимфоцитне леукемије (BCL-1) ће се апликовати интравенски у дози од 107 станица сингеним BALB/c мишевима, старости 8-10 тједана. Од 10. дана експеримента мишевима ће се на 3 дана узимати периферна венска крв за одређивање броја мононуклеарних станица. Када број лимфоцита у крви пријеђе 5x10⁶/ml мишеви ће почети да примају испитиване комплексе, а контролни мишеви ће примати цисплатину, флударабин, циклофосфамид и физиолошку отопиу, интравенски 3 пута тједно 60 дана. Дозе комплекса које ће се користити за ин виво примјену израчунат ће се на темељу ин витро испитивања цитотоксичности на BCL-1 станичној линији. Пратит ће се преживљавање по скупинама. Мишеви ће се жртвовати 60. дана покуса (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измијењено понашање).

Испитивање ефекта комплекса на клиничке манифестације CLL: одредит ће се укупан број лимфоцита у периферној крви издвојеној по жртвовању, а проточном цитометријом ће се анализирати утјецај комплекса на смањење релативне заступљености BCL-1 станица (CD19+CD5+) у периферној крви. Исјечци узорака јетре, слезене и

лимфних чворова добивени након жртвовања животиња, ће се након стандардног третмана бојити хематоксилином и еозином (H&E) те у њима микроскопском анализом регистrirати присуство метастатских станица. Присуство метастаза ће се потврдити имунохистохемијским бојењем CD5+В лимфоцита.

Процена апоптотског ефекта испитиваних комплекса *in vivo*: проточном цитометријом ће се анализирати постотак апоптоточних CD5+ В лимфоцита (Annexin V +) у периферној крви мишева третираних различитим комплексима и у контролних мишева. Апоптоза туморских станица ће се у ткивним исјечцима анализирати TUNEL методом.

Испитивање токсичности комплекса: у серуму ће се утврдити разина јетрених ензима AST и ALT који могу указати на евентуалну хепатотоксичност, издвојит ће се јетра и бубрези за хистолошку анализу евентуалних токсичних ефеката.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вриједностима серумске концентрације AST и ALT у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t test (два неовисна узорка), успоређујући групе међу собом (у оба смијера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтијева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 48 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t test за два неовисна узорка или Mann-Whitney testom) између двије групе животиња, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата користит ће се комерцијални програмски пакет SPSS верзија 18.

Статистичка обрада података

Добивени резултати ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне грешке. Статистичка значајност ће се одређивати Student-ovim t тестом, а по потреби и Mann-Whitney U тестом и ANOVA тестом. Статистичка значајност ће бити претпостављена за $p=0.05$. Све статистичке анализе ће бити обављене употребом програма SPSS 18.0.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да новосинтетизирани комплекси платине испоље цитотоксични ефект на станице кроничне лимфоцитне леукемије *in vitro* и *in vivo*. Познато је да су CLL станице склоне развоју резистенције на стандардне кемотерапеутике и да је та резистенција најчешће резултат промијењене функције p53 молекула. Како је скоро откривено да цисплатина модулира функцију сигналних молекула у лимфоцитима очекујемо да ће и наши комплекси платине модулирати функцију сигналних молекула у CLL станицама и тако индуцирати њихову смрт, а такав механизам дјеловања је праћен слабијим развојем резистенције.

Овим испитивањем би евентуално указали на нове комплексе платине који би се могли користити у наредним претклиничким истраживањима у циљу добивања нових терапеутика за лијечење CLL.

2.9. Оквирни садржај дисертације

В-кроничну лимфоцитну леукемију карактеризира акумулација малигно трансформираних В лимфоцита у периферној крви који пролазе кроз циклусе слабе пролиферације и мировања на периферији до реактивације и клонске експанзије у лимфним органима. За

сада нема лијека на који CLL станице с временом не развијају резистенцију која је углавном праћена измјенама функције p53. Сматра се да би нови терапеутици који модулирају сигналне путеве с BCR-а и других мембранских молекула могли ефикасније дјеловати на агресивнији тип CLL и да су праћени слабијим развојем резистенције. Претпостављајући да новосинтетизирани комплекси платине као и цисплатина модулирају сигналне путеве, у овој студији ће се испитати њихов терапијски потенцијал у CLL.

Антитуморски ефект новосинтетизираних комплекса платине испитат ће се МТТ тестом, анализом станица бојених Annexin-om V и пропидијум јодидом (PI), анти-KI67 антитијелом и анализом станичног циклуса. Испитат ће се и утјецај комплекса платине на фенотип CLL станица и активност два сигнална пута кључна у патогенези CLL, PI3/Akt и NF-κB/STAT3. Животињама ће болест бити индуцирана интравенском применом BCL-1 станица, а настала болест ће се дијагностицирати периодичним бројањем станица периферне крви. Испитат ће се утјецај примјене комплекса платине на формирање метастаза у секундарним лимфним органима, фенотип CLL станица изолираних из периферне крви, лимфних чворова и слезене мишева те процјена апоптозе ових станица *in vivo*. Процијенит ће се и хепато- и нефро-токсичност нових комплекс платине.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже доц. др Марију Миловановић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија. Доц. др Марија Миловановић 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. Volarevic V, Vujić JM, Milovanovic M, Kanjevac T, Volarevic A, Trifunovic SR, Arsenijevic N. Cytotoxic effects of palladium (II) and platinum (II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl) pentanoic acid on human colon cancer cell lines. J BUON. 2013;18(1):131-7.
2. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, Zdravkovic N, Tesic Z, Lukic A. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. Med Chem. 2012;8(1):40-5.
3. Arsenijević M, Milovanovic M, Volarevic V, Djeković A, Kanjevac T, Arsenijević N, Dukić S, Bugarcic ZD. Cytotoxicity of gold(III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. Med Chem. 2012 Jan;8(1):2-8.
4. Vujić JM, Kaluđerović GN, Milovanović M, Zmejkovski BB, Volarević V, Živić D, Đurđević P, Arsenijević N, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. Part VII. Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid. Eur J Med Chem. 2011;46(9):4559-65.
5. Vujić JM, Cvijović M, Kaluđerović GN, Milovanović M, Zmejkovski BB, Volarević V, Arsenijević N, Sabo TJ, Trifunović SR. Palladium(II) complexes with R(2)edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis,

- characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. Eur J Med Chem. 2010;45(9):3601-6.
6. Milovanović M, Djeković A, Volarević V, Petrović B, Arsenijević N, Bugarcic ZD. Ligand substitution reactions and cytotoxic properties of $[Au(L)Cl_2]^+$ and $[AuCl_2(DMSO)_2]^+$ complexes (L=ethylenediamine and S-methyl-L-cysteine). J Inorg Biochem. 2010;104(9):944-9.
 7. Volarevic V, Milovanovic M, Djekovic A, Petrovic B, Arsenijevic N, Bugarcic ZD. The cytotoxic effects of some selected gold(III) complexes on 4T1 cells and their role in the prevention of breast tumor growth in BALB/c mice. J BUON. 2010;15(4):768-73.

4. Научна област дисертације

Медицина.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, председник
2. **Доц. др Гордана Радић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
3. **Доц. др Јелена Пантић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
4. **Проф. др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска статистика и информатика, члан
5. **Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

Закључак и предлог Комисије

На основу досадашњег научно- истраживачког рада, кандидат др мед. Žana Besser Silconi, 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. др мед. Žane Besser Silconi, под називом "**Citotoksičnost kompleksa platine u mišjem modelu kronične limfocitne leukemije**" и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Тибор Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, председник

Доц. др Гордана Радић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан

Доц. др Јелена Пантић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Проф. др Небојша Здравковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска статистика и информатика, члан

Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

У Крагујевцу, 27. 04. 2016.