

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-268/61 од 13.04.2016. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Саше Беназић, под називом:

"Citotoksičnost kompleksa cinka u eksperimentalnom modelu karcinoma dojke miša"

Чланови Комисије су:

1. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганичка хемија, председник
2. **Доц. др Гордана Радић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
3. **Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
4. **Проф. др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска статистика и информатика, члан
5. **Доц. др Срђан Нинковић**, доцент 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 Ријеци. Медицински факултет у Ријеци 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 хладњацима 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 ECPD и Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: "Citotoksičnost kompleksa cinka u eksperimentalnom modelu karcinoma dojke miša"

Предмет: Цинк је есенцијални елемент, који као интегрални дио многих протеина и транскрипцијских фактора учествује у регулацији кључних реакција у станици као што су одговор на оксидативни стрес, репликација DNA, поправка оштећене DNA, трансдукција сигнала, станични циклус, апоптоза. Цинк учествује у структурној стабилизацији и активацији p53 молекула који има важну улогу у регулацији апоптозе.

Хипотеза: новосинтетизирани комплекси цинка, у успоредби са цисплатином и стандардним лијековима који се користе за лијечење тумора дојке, доксорубицином и циклофосфамидом, показују израженији антитуморски ефект *in vitro* на 4T1 станицама и *in vivo* у експерименталном моделу карцинома дојке.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је публикувао 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 **M52**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Пролиферација станица је строго контролисана механизмима регулације станичног циклуса који су поремећени у туморским станицама. Станични циклус и контролне тачке станичног циклуса у потпуности зависе од активности циклин овисних киназа. Ензимски комплекси циклин овисних киназа и циклина својом активношћу воде станицу кроз станични циклус и станичну диобу. У малигно трансформисаним станицама прекинути су механизми којима се регулира пролиферација. Са друге стране уколико се и у туморској станици активност циклин овисних киназа смањи из било којег разлога (оштећење DNA, дјеловање неког лијека, активирања контролних механизма...) станични циклус се зауставља и станица остаје у стању мировања док не прими другачији сигнал.

Карцином дојке, после карцинома плућа, има највећу инциденцију међу туморима на свијету, међу најчешћим узроцима смрти у свијету заузима пето мјесто, а међу туморима водећи је узрок смрти код жена. У развоју и прогресији карцинома дојке значајну улогу имају промјене гена које за посљедицу имају промјену функционирања кодираних молекула. Постоје докази да бројне microRNA утјечу на промијењену функцију гена и тако доприносе почетку канцерогенезе. Такођер поремећај различитих механизма који за посљедицу имају оксидативни стрес (на примјер поремећај синтезе естрогена и метаболита

естрогена), и ослобађање кисикових слободних радикала, доприноси нестабилности генома и последичном развоју карцинома дојке.

Удаљене метастазе и локални рецидиви су главни узрок смрт обољелих од карцинома дојке. Резистенција на постојеће лијекове који се користе у кемотерапији представљају и даље главну препреку у лијечењу карцинома дојке, због чега постоји стална потреба за истраживањем нових потенцијалних кемотерапеутика. Лијекови на које се у најмањем постотку развија резистенција тумора су они који дјелују као инхибитори циклин овисних киназа. Показано је да је механизам којим комплекси цинка показују цитотоксички ефекат инхибиција активности циклин овисних киназа.

2.5. Значај и циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је да се утврди потенцијални анитуморски ефект новосинтетизираних комплекса цинка *in vitro* кориштењем 4T1 станичне линије миша и *in vivo* у експерименталном моделу тумора.

У складу са основним циљем постављени су сљедећи експериментални задаци:

- Утврдити цитотоксичку активност комплекса цинка на 4T1 станичној линији *in vitro*
- Испитати утјецај комплекса цинка на станични циклус и митотску активност станица 4T1 станичне линије *in vitro*
- Испитати утјецај комплекса цинка на активност циклин овисних киназа *in vitro*
- Испитати дјеловање комплекса цинка *in vivo* на анималном моделу тумора дојке
- Испитати евентуалне нежељене токсичне ефекте (хепато- и рено- токсичност) комплекса цинка
- Утврдити да ли и у којој мери комплекси цинка показују имунодулаторни ефект

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Описано је више различитих комплекса цинка који показују антимиembroно, антиконвулзивно, антиинфламацијско и анитуморско дјеловање. Zn(II) комплекси су у упоредби са цисплатином показали израженији цитотоксички ефекат *in vitro* на различитим туморским станичним линијама и у експерименталном моделу карциноматозе. Показано је да комплекси цинка могу успорити прогресију тумора индуцирану кемијским агенсима код штакора. Цитотоксички ефект цинка је овисан о дози. Показано је да комплекси цинка смањују постотак станица које су у G1, G2 и S фази станичног циклуса, а повећавају постотак станица које су суб-G1 фази односно у апоптози. Такођер комплекси цинка инхибирају активност циклин зависне киназе 2 и тако заустављају станични циклус у туморским станицама. С обзиром да податци указују да је употреба кемотерапеутика који дјелују као инхибитори циклин овисних киназа праћена најнижим ступњем развоја клиничке резистенције, а да је за одређене комплексе цинка показано да инхибирају активност циклин зависне киназе 2, испитали бисмо потенцијални цитотоксички ефект новосинтетизираних комплекса цинка *in vitro* на станицама карцинома дојке миша (4T1) и анитуморски ефект *in vivo* у ортотопском експерименталном моделу карцинома дојке.

2.7. Методе истраживања

Врста студије: Експериментална студија.

Станична култура и испитиване твари: 4T1 станична линија (ATCC[®] CRL-2539[™]) ће се култивирати у стандардним увјетима (RPMI 1640 медиј са 2 mM L-глутамин и 10% феталног говеђег серума). За испитивање *in vitro* ефеката комплекса користити ће се стандардно култивиране 4T1 станице. Испитати ће се утјецај новосинтетизираних комплекса цинка добијени са Института за хемију, Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Као контролне супстанце користити ће се цисплатина и карбоплатина, те неки од лијекова који се стандардно користе за лијечење карцинома дојке доксорубицин и циклофосфамид. Испитиване супстанце ће се примењивати интравенски, три пута недељно, од 14. дана експеримента (кад се и очекује појава палпабилног тумора) у периоду од три недеље. Мишеви ће се жртвовати 40. дана покуса (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измијењено понашање).

Експерименталне животиње: Као експерименталне животиње користити ће се мишеви соја BALB/с женског пола, старости од 8 до 10 недјеља. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Тестови цитотоксичности и митотске активности:

MTT тест за испитивање цитотоксицког дјеловања: 4T1 станице (5×10^4 станица/ml) претходно излагане испитиваним тварима у различитим временским интервалима и концентрацијама изложити ће се МТТ кемијском споју 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid у трајању од 4 сата у микротитар плочама са 96 отвора. Интензитет боје накупљен у станицама се одређивати ће се колориметријски и интензитет боје је пропорционалан броју живих станица.

Процјена пролиферативне способности: анализа проточном цитометријом станица фиксираних 90% етанолом и обојених КИ67 mAb коњуграним 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 $\mu\text{g/ml}$ PI у присуству 0.5 mg/ml RN-ase у трајању од 30 минута у мраку на собној температуре ће се користити за анализу дистрибуције DNA и анализу станичног циклуса.

Анализа активности циклин овисних киназа: у лизату станица третираних испитиваним комплексима цинка и у хомогенатима туморског ткива након третмана комплексима испитати ће се се релативна количина циклин овисне киназе Cdc2 и циклина В који започињу митозу и имају кључну улогу у регулацији станичног циклуса. Киназна активност ће се одредити кориштењем комерцијалног кита који у основи користи ELISA технику.

Ортотопски експериментални модел карцинома дојке и примјена испитиваних твари: Тумори ће се индуцирати апликацијом слабо имуногене малигне станичне линије 4T1, сингене за BALB/С мишеве. Туморске станице ће се убризгавати субкутано у дози 5×10^4 у 50 μL медијума, директно у млијечну жлијезду број 4. Раст палпабилног примарног тумора пратиће се свакодневно уз истовремено морфометријско одређивање његовог волумена. Волумен тумора се израчунава по формули $V (\text{mm}^3) = L (\text{већи промјер}) \times W (\text{мањи промјер}) / 2$.

Када величина примарног тумора достигне величину 2mm^3 мишеви ће почети добивати испитиване комплексе, а контролни мишеви ће добивати цисплатину, доксорубицин,

циклофосфамид и физиолошку отопину, интравенски 2 пута недјељно, 30 дана. Дозе комплекса које ће се користити за *in vivo* примјену израчунати ће се на темељу *in vitro* испитивања цитотоксичности на 4T1 станичној линији. Пратити ће се преживљавање по скупинама. Мишеви ће се жртвовати 30 дана након почетка примјене испитиваних комплекса (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измијењено понашање).

Испитивање ефеката комплекса на развој метастаза: Мишеви ће се жртвовати цервикалном дислокацијом, након чега ће им се узети крв из абдоминалне аорте. Изолирати ће се примарни тумор, регионални лимфни чворови, слезена, плућа и јетра. Направити ће се парафински препарати од ткива плућа и јетре, те обојити еозин-хематоксилинским бојењем (стандардно патохистолошко бојење). Микроскопирањем, одредити ће се број и величина метастатских колонија по мишу у плућима и јетри.

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

Процјена апоптотског ефекта испитиваних комплекса *in vivo*: TUNEL методом ће се анализирати постотак апоптотичних туморских станица у исјечцима ткива примарног тумора и ткива јетре и плућа.

Процјена имуномодулаторних карактеристика комплекса цинка: Мононуклеарне станице регионалних лимфних чворова (ингвинални лимфни чворови) и слезене изолирати ће се 30 дана од почетка примјене комплекса и проточном цитометријом анализирати ће се удио Т лимфоцита и НК станица у свим групама мишева. Анализирати ће се фенотип и функционалне карактеристике ових станица.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је на основу података о вриједностима постотка CD4+ лимфоцита у лимфним чворовима 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), успоређујући групе између себе (у оба смјера), 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 42 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 двије групе животиња, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добивених резултата користити ће се комерцијални програмски пакет SPSS верзија 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 новосинтетизирани комплекси цинка покажу цитотоксички ефект на станице карцинома дојке миша *in vitro* и *in vivo*. Употреба кемотерапеутика веома је често праћена развојем резистенције. До сада није откривена клиничка резистенција на лијекове који дјелују као инхибитори циклин овисних киназа, а показано је да одређени Zn(II) комплекси инхибирају ове киназе и тако манифестирају цитотоксички ефект. Очекујемо да ће и наши комплекси цинка показати значајан цитотоксички ефект на станице карцинома дојке и инхибирати активност циклин овисних киназа.

Овим истраживањем указали би на нове комплексе цинка који би се могли користити у наредним претклиничким истраживањима у циљу добивања нових терапеутика за лијечење карцинома дојке.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Резистенција тумора на кемотерапијом је и даље главна препрека у лијечењу. Лијекови на које се у најмањем постотку развија резистенција тумора су они који дјелују као инхибитори циклин овисних киназа. Ако претпоставимо да новосинтетизирани комплекси цинка такођер инхибирају активност циклин овисних киназа, у овој студији ће се испитати њихов терапијски потенцијал код карцинома дојке.

Антитуморски ефект новосинтетизираних комплекса цинка ће се испитати МТТ тестом, анализом станица обојених Annexin-om V и пропидијум јодидом (PI), анти-KI67 протутијелом и анализом станичног циклуса. Испитати ће се и утјецај комплекса цинка на активност циклин овисне киназе 2. Животињама ће примарни тумор бити индуциран директном апликацијом 4T1 станица сингених за BALB/c мишеве у четврту млијечну жлијезду, а свакодневно ће се пратити појава тумора и мјерити дијаметар насталог тумора. Анализом фенотипа моноклеарних станица изолираних из лимфних чворова и слезене мишева који су примили комплексе цинка испитати ће се евентуални имуномодулаторни ефект цинка. Процијенити ће се и хепато- и нефро-токсичност нових комплекса цинка.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **доц. др Гордану Радосављевић**, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија. Доц. 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. G. Radosavljevic, I. Jovanovic, I. Majstorovic, M. Mitrovic, V. Juranic Lisnic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, M.L. Lukic. 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. G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, D.K. Hsu, M.L. Lukic. 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. and Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur J Immunol* 2011; 41(7):1902-1912.
5. I.P. Jovanovic, N.N. Pejnovic, G.D. Radosavljevic, N.N. Arsenijevic, M.L. Lukic. 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 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 Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
4. **Проф. др Небојша Здравковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска статистика и информатика, члан
5. **Доц. др Срђан Нинковић**, доцент 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 u eksperimentalnom modelu karcinoma dojke miša**" и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

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

Доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

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

Доц. др Срђан Нинковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

У Крагујевцу, 27. 04. 2016.