

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
 ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
 У КРАГУЈЕВЦУ

| | | | |
|-----------|------|----------|------------|
| Примљено | | 05.09.17 | |
| Орг. јед. | Број | Примљено | Безбедност |
| 05 | 4516 | | |

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број 01-610/ 3-4 од 25.01.2017. године, на седници одржаној 08.02.2017 године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др **Петра Чановића** под називом:

“Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије *in vitro*“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, председник;
2. **Проф. др Живадин Бугарчић**, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;
3. **Доц. др Соња Мисирлић Денчић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Београду за ужу научну област *Медицинска и клиничка биохемија*, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др **Петар Чановић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Петар Чановић је рођен 02.11.1989. године у Крагујевцу. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу завршио је у јулу 2014. године са просечном оценом 9,46. Новембра 2014. године изабран је у звање сарадник у настави за ужу научну област Биохемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Школске 2014/15. године уписао Академске докторске студије смер Клиничка и експериментална биохемија, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит положио је децембра 2016. године са оценом 10. Од 7.09.2016. године је изабран у звање асистента за ужу научну област Биохемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије *in vitro*“

Предмет: Упркос успеху у лечењу различитих врста тумора, клиничка ефикасност цисплатине је веома ограничена развијањем резистенције тумора на лек и појавом изражених нежељених ефеката. Из тог разлога постоји потреба за проналажењем нових једињења која садрже метале и која су мање токсична и боље се подносе *in vivo*. Комплекси рутенијума представљају таква једињења. Предност комплекса рутенијума у односу на цисплатину је, с једне стране, у томе што приликом транспорта кроз организам имитирају механизам допремања гвожђа у ћелије, док са друге стране, имају мању токсичност, већи степен селективности за тумор и бољу инхибицију прогресије раста тумора.

Хипотезе: Новосинтетисани комплекси рутенијума(II) делују цитотоксично на туморске ћелије, а не делују цитотоксично на здраве фибробласте. Претпоставка је да примена новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) може значајно да смањи вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе. Хипотеза ће се тестирати кроз серију *in vitro* експеримената, у складу са наведеним циљевима.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, др Петар Чановић, је објавио рад у целини у часопису категорије M52 штампаном на једном од водећих светских језика, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације:

1. **Canović P**, Vranic A, Petrovic S, Rakovic I, Popovska Jovicic B, Hamzagic N. Analysis of clinical, haematological and biochemical parameters in patients with infectious mononucleosis. *Ser j exp clin res* 2015; 16 (4): 291-95.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

У потрази за агенсима који садрже метале и имају антитуморско деловање до сада су углавном испитивана једињења платине. Међутим, показано је да једињења рутенијума имају мању токсичност, већи степен селективности за тумор, бољу инхибицију прогресије раста тумора као и веће антиангиогенетске карактеристике у односу на комплексе платине. Сматра се да ове особине једињења рутенијума потичу од њихове способности да имитирају начин везивања гвожђа за биомолекуле као што су хумани серум албумин и трансферин. Будући да туморске ћелије на својим мембранама повећано експримирају трансферинске рецепторе због повећане потребе за гвожђем, допремање комплекса рутенијума до канцерских ћелија је ефикасније у односу на једињења платине. У последњих неколико деценија испитивани су Ru(II) полипиридил комплекси и показано је да механизам њиховог дејства потиче од начина везивања за ДНК молекулу. Утврђено је да се већина комплекса Ru(II)–трп везује ковалентним везама за ДНК молекулу, углавном за азотну базу гуанин и да се на тај начин онемогућава ДНК репликација туморских ћелија. Такође, показано је да од хемијске структуре комплекса рутенијума тј. од природе лиганда који је координативно везан за јон рутенијума зависи начин везивања комплекса за протеине, липофилност односно могућност уласка комплекса у ћелију, хидросолубилност односно начин транспорта до ћелија као и сам начин везивања за ДНК молекулу.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у испитивању антитуморског ефекта новосинтетисаних рутенијум(II) комплекса *in vitro*. Циљ ове студије је да се испита цитотоксични ефекат новосинтетисаних рутенијум(II) комплекса на туморске ћелије као и на контролне ћелије, фибробласте. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитивање потенцијалне цитотоксичности комплекса рутенијума:
 - а) $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{o-pda})\text{Cl}]\text{Cl}$ (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, o-pda = o-fenilendiamin) (у даљем тексту: комплекс Ru-1)
 - б) $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$ (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) (у даљем тексту: комплекс Ru-2) на следећим ћелијама:
 - 1) A549 – карцином плућа,
 - 2) MCF-7 – карцином дојке,
 - 3) HeLa – карцином цервикса,
 - 4) НТВ-140 – малигни меланом,
 - 5) MRC-5 – фибробласти (контрола).
2. Одредити релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама.
3. Утврдити утицај испитиваних супстанци на релативни однос проапоптотичног Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина.
4. Одредити ефекат испитиваних супстанци на локализацију цитохрома c и активацију Вах-а и каспазе-3.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Истраживања су показала да различити комплекси рутенијума имају антитуморски ефекат на шири спектар туморских ћелија у односу на једињења која у својој хемијској структури садрже платину. Испитивање ефекта комплекса рутенијума $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ и комплекса $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ на ћелијске линије A549 и НСТ116 показала су да $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ ефикасније делује на A549, док $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ ефикасније делује на НСТ116.

trpy)(dach)Cl][Cl] показује бољи цитотоксични ефекат на HCT116 ћелијску линију. Такође, рутенијумски комплекс терпиридинске структуре $[\text{Ru}(\text{biphtpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ има антиканцерско дејство на ћелијске линије карцинома цервикса HeLa, хепатоцелуларног карцинома Hep-G2 и BEL-7402, као и на ћелијске линије карцинома плућа A549 и A549/CDDP. Два антитуморска комплекса рутенијума $[\text{IndH}][\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ (Ind = indazole, KP1019) и $[\text{ImH}][\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO-S})]$ (Im = imidazole, NAMI-A) су успешно ушла у клиничка истраживања, као обећавајући антиканцерогени лекови. Новија истраживања показала су да комплекс рутенијума формуле $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{N-N})\text{X}][\text{PF}_6]$ поседује антитуморску активност *in vitro* и *in vivo*.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

2.7.2. Варијабле

У свим узорцима који буду укључени у студију одређиваће се вијабилност ћелија 24, 48 и 72 часа након третмана различитим концентрацијама испитиваних комплекса у односу на нетретирание ћелије применом МТТ теста. Релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним комплексима испитаће се методом проточне цитометрије ћелија бојених Annexin-ом V и 7-аминоактиномицином D. Такође, проточном цитометријом и бојењем специфичним антителима за Вах, Bcl-2, цитохром c и активну каспазу-3 ћемо одредити релативни однос проапоптотичног Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина, односно проценат ћелија код којих је дошло до транслокације цитохрома c и активације Вах-а и каспазе-3 у групи третираних у односу на нетретирание туморске ћелије.

Независне варијабле: представљаће примењени новосинтетисани комплекси рутенијума(II).

Зависне варијабле: представљаће измерене вредности параметара вијабилности и апоптозе туморских ћелија.

2.7.3. Снага студије и величина узорка

Величина група је одређена на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 95%, вероватноће грешке првог типа (α) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе. Укупна величина узорка (total sample size=54) израчуната је на основу програма *G power* и коришћењем теста корелације (Correlation: point biserial model). Вредност коефицијента детерминације (ρ^2) је 0.2. После урађене половине предвиђених експеримената биће учињена прелиминарна статистичка анализа на основу чијих резултата се укупни студијски узорак може смањити.

2.7.4. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov*, *Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Предложена студија ће омогућити:

1. Боље разумевање цитотоксичног ефекта комплекса рутенијума на туморске ћелије.
2. Испитивање механизма деловања комплекса рутенијума кроз испитивање експресије и активације про- и антиапоптоских протеина.

Најзначајнији одговор који се надамо да ћемо добити је потенцијално антитуморско дејство испитиваних комплекса рутенијума. Задовољавајући резултат би

био проналажење комплекса рутенијума који би у одређеним концентрацијама и након адекватног временског интервала, смањио вијабилност туморских ћелија, а истовремено не би утицао на фибробласте. Таква супстанца би могла даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за лечење испитиваних типова карцинома.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Циљ овог истраживања је да испита ефекат примене новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије и фибробласте. Затим, да се одреди релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама као и активност одређених протеина укључених у унутрашњи пут апоптозе. Предложена студија ће омогућити боље разумевање цитотоксичног ефекта комплекса рутенијума на туморске ћелије.

3. Предлог ментора

За ментора докторске дисертације под називом “**Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије *in vitro***“ се предлаже проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*. Проф. др Иванка Зелен поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Ванредни проф. др Иванка Зелен који су у вези са темом докторске дисертације:

1. I.Nikolic, M. Andjelkovic, M. Zaric, **I. Zelen**, P. Canovic, Z. Milosavljevic, M. Mitrovic. Induction of mitochondrial apoptotic pathway by raloxifene and estrogen in human endometrial stromal ThESC cell line. Arch Med Sci DOI: 10.5114/aoms.2016.59874

2. Andjelkovic M, Jankovic S, Mitrovic M, Mladenovic V, Nikolic I, **Zelen I**, Zaric M, Canovic P, Folic M. Effects of cardiovascular drugs on TSH serum levels in patients on replacement therapy after thyroidectomy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016;54(8):628-33.
3. Zaric M, Mitrovic M, Nikolic I, Baskic D, Popovic S, Djurdjevic P, Milosavljevic Z, **Zelen I**. Chrysin Induces Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes Isolated from Human Chronic Lymphocytic leukemia. *Anticancer Agents Med Chem* 2015;15(2):189-195.
4. Baskic D, Popovic S, Bankovic D, Arsovic A, Vukovic V, **Zelen I**, Djurdjevic P. Evaluation of inflammatory biomarkers as helping diagnostic tool in patients with breast cancer. *Cancer Biomark* 2014; 14(6):401-408.
5. Milosavljevic Z, **Zelen I**, Sazdanovic M. Autonomic innervation of the periglomerular arteries. *Anal Quant Cytopathol Histpathol* 2014; 36(3):161-6.
6. I. Nikolic, M. Mitrovic, **I. Zelen**, M. Zaric, T. Kastratovic, M. Stanojevic, M. Nenadovic, T. Stojanovic. Inhibitory role of monovalent ions on rat brain cortex adenylyl cyclase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2013; 28(5):1061-1066.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална биохемија.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, председник;
2. **Проф. др Живадин Бугарчић**, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;
3. **Доц. др Соња Мисирлић Денчић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Београду за ужу научну област *Медицинска и клиничка биохемија*, члан;

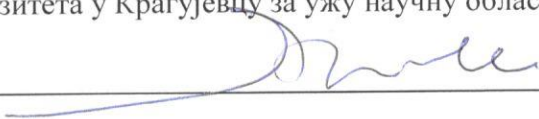
Закључак и предлог комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада, кандидат др Петар Чановић, 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 Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Петра Чановића, под називом **“Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије *in vitro*“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др **Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, председник;



2. Проф. др **Живадин Бугарчић**, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;



3. Доц. др **Соња Мисирлић Денчић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Београду за ужу научну област *Клиничка биохемија*, члан;



У Крагујевцу, 13. 03. 2017. године