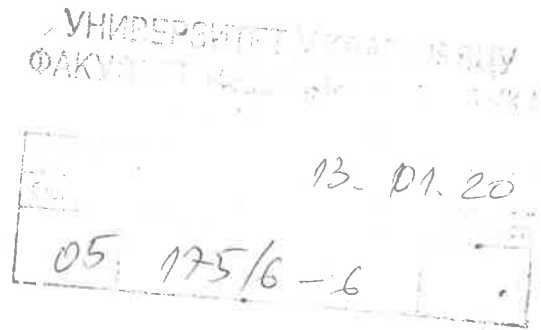


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-910/38, од 13. 11. 2019. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Žane Besser Silconi, под називом:

„Citotoksičnost kompleksa platine(IV) u kroničnoj limfocitnoj leukemiji *in vitro* i *in vivo* na mišjem modelu”

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 Пантић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
3. доц. др Јелена Пољаревић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;
4. проф. др Предраг Ђурђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, члан;
5. проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биохемија, 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 Риједи 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 ECPD и Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Citotoksičnost kompleksa platine(IV) u kroničnoj limfocitnoj leukemiji *in vitro* i *in vivo* na mišjem modelu”

Предмет: Овим истраживањем би се испитао потенцијални анитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса платине(IV) *in vitro*, коришћењем ћелијске линије хроничне мишје В леукемије- ВСL-1 и *in vivo* коришћењем експерименталног модела CLL-а.

Хипотеза: Новосинтетисани комплекси платине(IV) са дериватима тиосалицилне киселине, у поређењу са цисплатином, испољавају израженији анитуморски ефекат *in vitro* на ВСL-1 ћелијама и *in vivo* у експерименталном моделу CLL-а.

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:

Besser Silconi Ž, Benazic S, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Milovanovic M, Kanjevac T. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res. 2015;16(3):181-6. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

CLL је честа углавном хетерогена болест коју карактерише прогресивна акумулација дисфункционалних В лимфоцита у костној сржи, крви и другим органима, што се карактерише леукоцитозом, лимфаденопатијом, хепатоспленомегалијом, дисфункцијом костне сржи, рекурентним инфекцијама и често аутоимунским поремећајима. Дуго се сматрало да је CLL резултат клонске акумулације неактивних трансформисаних В лимфоцита који су резистентни на апоптозу, иако ову карактеристику губе по изолацији из организма, што указује да на биологију CLL ћелија директно утичу фактори из окружења и/или интеракције адхезивних молекула. Већина CLL ћелија у периферној крви је у G0/G1 фази ћелијског циклуса и експримира гене карактеристичне за неактивирани В лимфоцити. Новије студије ове болести указују да постоји и значајна пролиферација CLL ћелија која се углавном одиграва у метастаским жариштима и да је интензивнија стопа пролиферације удружена са агресивнијом формом болести.

Цисплатина испољава биолошке ефекте везивањем и за ДНК и за протеине и инхибише транскрипцију и репликацију ДНК што резултује апоптозом и/или некрозом ћелија и користи се за лечење различитих тумора. Терапијска примена цисплатине је повезана са појавом озбиљних нежељених дејстава, али и честим развојем резистенције. Друга генерација аналога цисплатине, оксалиплатин, сатраплатин, испољавају блажу хепато- и нефро- токсичност у поређењу са цисплатином, па су и даље актуелни покушаји добијања ефикаснијих, али мање токсичких комплекса платине.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Основни циљ овог истраживања је да се утврди потенцијални анитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса платине(IV) *in vitro*, коришћењем ћелијске линије хроничне мишје В леукемије- BCL-1 и *in vivo* коришћењем експерименталног модела CLL-а.

У складу са основним циљем постављени су и следећи експериментални задаци:

- Одредити цитотоксичну активност комплекса на ћелијској линији BCL-1.
- Одредити способност комплекса да индукује апоптоску смрт ћелија BCL-1 *in vitro* и *in vivo* у животињском моделу болести.
- Испитати релативни однос про- и анти- апоптоских молекула као и каспазе-3 у ћелијама BCL-1 третираним комплексом платине.
- Истражити утицај платинског комплекса на ћелијски циклус ћелијских линија BCL-1.
- Испитати утицај платиновог комплекса на активност сигналног пута STAT3 у ћелијама BCL-1, испитати експресију гена Nanog, Sox2, Oct4, Myc и циклин D3.
- Истражити утицај платинског комплекса на активност NF- κ B у ћелијама BCL-1.
- Проучити утицај платиновог комплекса *in vivo* на животињском моделу CLL-а изазваног BALB/с мишевима интравенским апликавањем BCL1 ћелијске линије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Пролиферација и отпорност CLL ћелија на апоптозу повезана је са активирањем више сигналних путева, међу њима и STAT3 (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription Molecules 3*). STAT3 регулише експресију гена чији производи контролишу ћелијску смрт, пролиферацију и зрелост. Показало се да инхибиција STAT3 зауставља туморске ћелије у G1 фази ћелијског циклуса, што је последица смањене експресије циклина D1 и инхибитора киназа зависних од циклина p21 и p27. Конститутивна активност NF- κ B пута откривена је у ћелијама CLL-а. Експресија гена коју контролише NF- κ B је већа у ћелијама CLL-а на месту жаришта него у ћелијама CLL-а добијеним из периферне крви. Конститутивна тоничка активација NF- κ B у ћелијама CLL-а може се појачати сигнаlima са BCR-а, а активирање сигнала пута JAK/STAT3 зависи од цитокина чију експресију контролише NF- κ B.

У скорије вријеме показано је да цисплатина редукује активност протеина укључених у спровођење сигнала с BCR-а и на тај начин регулише пролиферацију ћелија. С обзиром да ћелије CLL-а развијају резистенцију на све до сада коришћене хемотерапеутике и да новији приступи лечења CLL-а подразумевају примену модулатора сигналних молекула планирано је испитивање потенцијалних цитотоксичких или цитостатских ефеката новосинтетисаних комплекса платине *in vitro* на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије миша (BCL-1), и анитуморски ефекат *in vivo* у експерименталном моделу CLL-а.

2.7. Методе истраживања

Врста студије: Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro* и на животињама *in vivo*.

Ћелијска култура и испитиване супстанце: BCL-1 ћелијска линија (ATCC® TIB-197™) ће се гајити у стандардним условима (RPMI1640 медијум са 2 mM L-глутамином, 0.05 mM 2-меркаптоетанолом и 15% феталног говеђег серума). За испитивање *in vitro* ефеката комплекса на BCL-1 ћелијској линији користиће се стандардно гајене BCL-1 ћелије и BCL-1 ћелије стимулисане 1) липополисахаридом (1 µg/ml); и 2) CD4+ лимфоцитима изолованих из лимфних чворова здравих BALB/c мишева, који експримирају CD40 молекула, у односу 1:100 (Т лимфоцит/CLL ћелије). Испитиваће се ефекти новосинтетисаних комплекса платине, а као контролне супстанце користиће се цисплатина [PtCl₂(NH₃)₂] и лекови који се стандардно користе за лечење CLL флударабин и циклофосфамид. Као контролне ћелије користиће се В лимфоцити изоловани магнетном сепарацијом из периферне крви BALB/c мишева.

Експерименталне животиње: Као експерименталне животиње користићемо мишеве соја BALB/c мушког пола, старости од 8 до 10 недеља. Све планиране процедуре одобрила је Етичка комисија за рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (01-8670, 17.07.2019. године).

Тестови цитототоскичности и митотске активности:

МТТ тест за испитивање цитототоскичког ефекта: CLL ћелије (10⁶ ћелија/ml) претходно излагане испитиваним супстанцама у различитим временским интервалима и концентрацијама ће се излагати МТТ супстанци 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид у трајању од 4 сата у микротитар плочама са 96 отвора. Интензитет боје у ћелијама се одређује колориметријски и интензитет боје је пропорционалан броју живих ћелија.

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

Квантитативно испитивање апоптотске смрти: анализа проточном цитометријом третираних ћелија бојених Annexin-ом В и пропијидијум јодидом (PI).

Анализа ћелијског циклуса: ћелије бојене 30 µg/ml PI у присуству 0,5 mg/ml RNaze у трајању од 30 минута у мраку на собној температури ће се користити за анализу дистрибуције DNA и анализу ћелијског циклуса.

Анализа експресије протеина проточном цитометријом: третиране ћелије BCL-1 ћелијске линије ће се бојити антителима специфичним за: CD5, CD19, Bc2-, Noxa1, ciklin D3, ciklin E, p6, p21, p27, Ki67, pSTAT3(Tyr705), pSTAT3(Ser727) i pNFkB(Ser536). Обележене ћелије ће бити анализирани помоћу FACSCalibur проточног цитометра (BD Biosciences) а анализа обављена коришћењем програма FlowJo (Tree Star).

Индукција болести и примена испитиваних супстанци: хронична лимфоцитна леукемија ће се индуковати интравенском апликацијом 10⁷ BCL-1 ћелија BALB/c мишевима старости 8-10 недеља. Од 10. дана експеримента мишеви ће примати селектовани комплекс платине(IV) и цисплатину, интравенски 3 пута недељно у току дана. Дозе комплекса које ће се користити за *in vivo* примену израчунаће се на основу *in vitro* испитивања цитотоксичности на BCL-1 ћелијској линији. Пратиће се преживљавање по групама. Мишеви ће се жртвовати 25. дана експеримента (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измењено понашање).

Испитивање токсичности комплекса: у серуму ће се утврдити концентрацију ензима јетре AST и ALT који могу указати на евентуалну хепатотоксичност, издвојиће се јетра и бубрези за хистолошку анализу евентуалних токсичких ефеката.

Испитивање ефекта комплекса на клиничке манифестације CLL: одредиће се укупан број лимфоцита у периферној крви издвојеној по жртвовању, а проточном цитометријом ће се анализирати утицај комплекса на смањење релативне заступљености BCL-1 ћелија (CD19+CD5+) у периферној крви. Исечци узорака плућа добијени након жртвовања животиња, ће се након стандардног третмана бојити хематоксилином и еозином (H&E) и у њима микроскопском анализом детектовати присуство малигнух инфилтрата.

Процена апоптотског ефекта испитиваних комплекса *in vivo*: проточном цитометријом ће се анализирати проценат апоптотичних CD5+ В лимфоцита (Annexin B+) у периферној крви мишева третираних различитим комплексима и код контролних мишева. Апоптоза туморских ћелија ће се у ткивним исечцима анализирати TUNEL методом.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима 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 тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), 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 15 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 испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити 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 новосинтетисани комплекси платине(IV) испоље цитототоскички ефекат на ћелије хроничне лимфоцитне леукемије *in vitro* и *in vivo*. Познато је да су CLL ћелије склоне развоју резистенције на стандардне хемотерапеутике и да је у агресивнијим облицима болести већа активност сигналног пута STAT3. Како је скоро откривено да дисплатина модулише функцију сигналних молекула у лимфоцитима очекујемо да ће и наши комплекси платине(IV) модулисати функцију сигналних молекула у CLL ћелијама и тако индуковати њихову смрт, а такав механизам деловања је праћен слабијим развојем резистенције.

Овим испитивањем би евентуално указали на нове комплексе платине који би могли да се користе у наредним претклиничким истраживањима у циљу добијања нових терапеутика за лечење CLL.

2.9. Оквирни садржај дисертације

За сада нема лека на који CLL ћелије временом не развију резистенцију. Сматра се да би нови терапеутици који модулишу сигналне руте са BCR-a () и других мембранских молекула могли ефикасније да делују на агресивнији тип CLL и да би били мање подложни развоју резистенције. Претпостављајући да новосинтетисани комплекси платине као и цисплатина модулишу сигналне руте, у овој студији ће се испитати њихов терапијски потенцијал у CLL.

Циљ студије је да се утврди потенцијални антитуморски ефекат нових комплекса платине(IV) у моделу мишије хроничне лимфоцитне леукемије.

Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса платине(IV) ће се испитати МТТ тестом, анализом ћелија бојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом (PI), anti-KI67 антителима и анализом ћелијског циклуса. Проточном цитометријом ће се у третираним ћелијама испитати експресија молекула који контролишу ћелијски циклус. Проточном цитометријом и PCR анализом ће се испитати утицај комплекса платине на експресију про- и анти- апоптотоских молекула и каспазе-3 у BCL-1 () ћелијама третираним *in vitro* и имунохистохемијском анализом у CLL ћелијама метастатских тумора у анималном моделу. Испитаће се и утицај комплекса платине на активност сигналног пута STAT3 и активацију NFκB. Животињама ће болест бити индукована интравенском трансплантацијом ћелија BCL-1, а настала болест ће се дијагностиковати и евалуирати периодичним бројањем ћелија периферне крви. Испитаће се утицај примене комплекса платине на формирање фокуса у секундарним лимфним органима, фенотип CLL ћелија изолованих из периферне крви, лимфних чворова и слезине мишева и процена апоптозе ових ћелија *in vivo*. Процениће се и хепато- и нефро- токсичност нових комплекса платине. Очекује се да испитивани комплекси испоље сличну цитотоксичност на CLL ћелије као и алкилирајући агенси, а да је тај ефекат резултат модулације сигналних путева потеклих од мембранских молекула.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Марију Миловановић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија. Проф. 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, Vujic 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. Arsenijevic M, **Milovanovic M**, Volarevic V, Djekovic A, Kanjevac T, Arsenijevic 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, Kaluderović 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, Kaluderović 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)Cl₂](+) and [AuCl₂(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 Гордана П. Радић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска хемија; председник;
2. **проф. др Јелена Пантић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
3. **доц. др Јелена Пољаревић**, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;
4. **проф. др Предраг Ђурђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, члан;
5. **проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биохемија, 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(IV) u kroničnoj limfocitnoj leukemiji *in vitro* i *in vivo* na mišjem modelu”** 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 Пантић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;



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



проф. др Предраг Ђурђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, члан;



проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биохемија, члан.



У Крагујевцу, 02. 12. 2019.