

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ  
НАУКА НАСТАВНО-НАУЧНОМ  
ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО: 29.04.2018			
Орг. јед.	Број	Порука	Бројност
05	4836-1		

### 1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-247/31, од 04.04.2018. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Ане Поповић, под називом:

**„Карактеризација и испитивање антитуморске активности комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине”**

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Проф. др Гордана Радић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан

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

## 2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

### 2.1. Кратка биографија кандидата

#### Лични подаци

Ана Поповић је рођена 02.09.1979. године у Подгорици. Завршила је основну школу и Гимназију са одличним успехом у Подгорици, Црна Гора. Дипломирала је на Медицинском факултету у Приштини дана 22.12.2008. године, чиме је стекла стручно звање доктор медицине. Специјалистички испит из Дерматовенерологије положила је 25.01.2017. на Медицинском факултету у Београду и стекла звање специјалисте дерматовенерологије.

Академске докторске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, смер Онкологија, уписала је школске 2010/2011. године. У току студија положила је све испите предвиђене планом и програмом. Тренутно на трећој години Академских докторских студија, смер онкологија.

Прве две године радног искуства провела је радећи у Дому здравља, Подгорица као изабрани доктор. Годину дана и шест месеци је провела у Институту за Јавно здравље у Подгорици, потом је 6 месеци радила као клинички лекар на Инфективном одељењу Опште болнице Никшић, потом је као специјализант годину дана провела на Клиници за Дерматовенерологију у Подгорици КЦЦГ а потом наредне три године на Клиници за Дерматовенерологију у Београду, КЦС. По положеном специјалистичком испиту свакодневно ординира у Дерматовенеролошкој амбуланти у Општој Болници Никшић.

Говори енглески језик. Познаје рад на рачунару.

### 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** „Карактеризација и испитивање антитуморске активности комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине”

**Предмет:** Структурна и биохемијска анализа и испитивање потенцијалног антитуморског ефекта новосинтетисаних комплекса цинка са дериватима тиосалицилне киселине:  $[Zn(S\text{-alil-thiosal})_2]$  -  $C_{22}H_{22}O_4S_2Zn$  (K6) и  $[Zn(S\text{-izobuten-thiosal})_2]$ - $C_{22}H_{22}O_4S_2Zn$  (K7).

#### Хипотезе:

Реакцијом алил и изобутен деривата тиосалицилне киселине и цинка направиће се комплекси чији састав и структура ће бити потврђени на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије.

Одговарајући комплекси цинка делују цитотоксично на туморске ћелије, а не делују цитотоксично на мезенхимне матичне ћелије.

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавила рад у целини у часопису категорије M51 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву теме докторске дисертације:

**Popovic A, Pechanova O, Rehakova R, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Jeremic J, Vranic A, Jakovljevic V.** Effects of provinols on cardiodynamics and coronary flow in isolated rat hearts. *Ser J Exp Clin Res.* 2016; 17(2): 99-105. **M51**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Након глобалног успеха примене „дисплатине” (*cis*-диамминдихлороплатине(II)) код људи кренуло се у потрагу за новим комплексним једињењима са израженом антитуморсиом активношћу. Истраживања у овој области дају акценат на откриће потенцијално медицински применљивих биолошки активних комплекса битних јона, међу којима је сврстан и јон цинка.

Значај испитивања биолошке активности комплекса цинка огледа се у томе да је интересовање истраживача на ту тему константно расте. Експериментише се са комплексима цинка, јер је он "ендогени" метал, па би можда могао да буде селективнији, тј. мање токсичан по здраве ћелије, а за разлику од гвожђа и бакра, цинк не учествује у редокс реакцијама, што је "недостатак" ових метала јер могу да фацилитирају оксидациони стрес, неутрализацију антиоксиданаса и слично. Поред тога, цинк учествује и у регулацији генске експресије, иако прецизан механизам није познат.

Претраживањем доступних литературних база података утврђено је да се до сада истраживачи нису бавили синтезом комплекса цинка са алил и изобутен дериватима тиосалицилне киселине као лигандима. Исто тако, у доступним спроведеним научним студијама није испитивана потенцијална антитуморска и кинетичка активност комплекса цинка са алил- и изобутен- дериватима тиосалицилне киселине.

### 2.5. Значај и циљ истраживања

#### *Значај студије*

Значај ове студије је у структурној и биохемијској анализи и утврђивању антитуморског ефекта новосинтетисаних комплекса цинка са дериватима тиосалицилне

киселине: [Zn(S-alil-thiosal)2] - C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Zn (K6) и [Zn(S-izobuten-thiosal)2]- - C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Zn (K7).

### *Циљ студије*

1. Одредити састав награђених једињења на основу резултата елементалне микроанализе.
2. Претпоставити сруктуру добијених комплексних једињења на основу инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије.
3. Испитати интеракцију новосинтетисаних комплекса са СТ-DNK.
4. Испитати потенцијалну цитотоксичку активност комплекса на мишијим ћелијским линијама колоректаног карцинома (СТ26), меланома (В16F1) и мезенхималних матичних ћелија (mMSCs).
5. Одредити релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама.
6. Испитати утицај новосинтетисаних комплекса на ћелијски циклус туморских ћелија.

### **2.6. Веза са досадашњим истраживањима**

Цинк је од есенцијалног значаја за функционисање неколико ензима и протеина, као на пример Zn, Cu-супероксид дисмутаза (аутоксидација). Раније спроведена истраживања су показала да комплекси цинка имају цитотоксичну активност. Резултати МТТ теста показали су да је ефекат убијања *kaempferol*-Zn био два пута већи од ефекта самог *kaempferol*-а. Атомска микроскопија показала је морфолошке и ултраструктурне промене ћелијске мембране индуковане *kaempferol*-Zn на субцелуларном или нанометарском нивоу. Поред тога, проточна цитометрија је показала да *kaempferol*-Zn може индуковати апоптозу регулисањем интрацелуларних јона калцијума. Комплекс цинка са триптофаном је идентификован као антипролиферативни агенс против U-87 MG ћелија са 5 пута повећањем апоптозе у односу на контролу. Друга студија је показала малу токсичност комплекса цинка са новицидином у нормалним ћелијама и високу потентност према туморским ћелијама. Комплекс је превасходно пенетрирао туморске ћелије а не и у нормалне ћелије. Поред тога, преузимање цинка потврђено је у обе ћелијске линије. Ови резултати сугеришу да комплекс Цинк-Новицидин има велики потенцијал као нови лек против рака. Још једна студија потврђује да комплекси цинка поседују већу цитотоксичност према пет одабраних хуманих туморских ћелија од слободног лиганда. Ови комплекси значајно повећавају експресију Chk1, Chk2, p21, p27 и p53, а смањују циклин А и Cdk2. Поред тога, индукују апоптозу у туморским ћелијама преко каспаза, митохондријалним путем и спољашњим путем.

Тиосалицилна киселина (2-меркаптобензоева киселина) и њени деривати имају многобројне примене, почевши од употребе код инфламаторних, алергијских и

респираторних обољења па до потенцијалне примене у спречавању цирозе јетре и у испитивању појаве фотоконтактнoг дерматитиса на лекове. Поменута киселина и њени деривати су у стању да се кординују са великим бројем јона метала што је важан предуслов за детаљна будућа истраживања таквих комплекса. Као ефективни лиганди за координацију могу се користити естри тиосалицилне киселине. То показују и публиковани радови о биолошкој активности комплекса бакра (II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине сведоче о умереном антимикуробном дејству и малој антигљивичној активности. Нова истраживања у светлу испитивања цитотоксичног потенцијала комплекса бакра (II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине су утврдила да поменути комплекс показује нешто мању цитотоксичност од цисплатине на хуманим НСТ-116 ћелијским линијама, као и на мишјим ћелијским линијама СТ26 и СТ26.CL25.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1 Врста студије**

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу мишјег порекла *in vitro*. За истраживање ће се користити две туморске ћелијске линије СТ26) и В16F1 и као контрола мезенхималне матичне ћелије (mMSCs) на којима ће бити испитивани комплекси цинка.

### **2.7.2 Варијабле које се мере у студији**

Независне варијабле студије (узрок) представљаће примењени комплекси цинка, а зависне варијабле (исход), представљаће измерене вредности параметара вијабилности и апоптозе туморских ћелија.

### **2.7.3 Узорковање**

#### ***Елементална микроанализа***

Елементална микроанализа биће извршена на Хемијском факултету Универзитета у Београду. Анализа ће бити спроведена на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer у CHS моду.

#### ***Инфрацрвена спектроскопија***

Снимање инфрацрвених спектра биће спроведено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу спектрофотометра Perkin-Elmer FTIR 31725X применом технике КВг пилуле.

#### ***Нуклеарно-магнетно-резонанционa спектроскопија***

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR) лиганата биће спроведено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу

спектрофотометра Varian Gemini-200 NMR користећи D<sub>2</sub>O за синтетисане једињења као растварач. Хемијска померања ће бити дата у односу на триметилсилан (TMS), употребом DDS као инертног стандарда.

### ***Интеракције комплекса са DNK***

#### ***Абсорпциона спектроскопска мерења***

Интеракције комплекса са DNK су проучаване помоћу Uv-Vis спектроскопије у циљу одређивања константе везивања ( $K_b$ ). Фосфатни пуфер (0,01 M, pH = 7,4) је коришћен за апсорпциона мерења. Серија раствора комплекс-DNK је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације (8  $\mu$ M) са инкрементима DNK полазног раствора (1,25 mM).

#### ***Флуоресцентна мерења***

Интеракције комплекса са DNK су испитиване и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације 527 nm, а флуоресцентне емисије на 612 nm. Ширина ексцитационог и емисионог прореза (10 nm) и брзина снимања су константне за све експерименте. Интеракције комплекса са DNK су проучаване у присуству EB да би се утврдило да ли комплекс може да замени EB из његовог DNK-EB комплекса. DNK-EB комплекс је припремљен мешањем 50  $\mu$ M EB и 50  $\mu$ M DNK (pH = 7,4). Могући ефекти везивања комплекса за DNK су проучавани снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса (0-80  $\mu$ M) у раствор DNK-EB. Пре мерења систем је инкубиран на собној температури у току 5 минута. Емисија раствора је снимана у области од 550 до 750 nm.

### ***In vitro* антитуморска активност**

Антитуморска активност добијених једињења биће урађена у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Као контролне супстанце користиће се цисплатина [PtCl<sub>2</sub> (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] и оксалиплатина.

### ***Припремање раствора испитиваних једињења***

Комплекси ће бити растворени у 10% диметилсулфоксиду (DMSO) који је разблажен у дестилованој води до концентрације од 10 mM и филтриран кроз *Millipore* филтер промера отвора 0,22  $\mu$ m. Ови раствори ће бити разблажени у медијуму за гајење непосредно пре употребе. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид је растворен (5 mg/mL) у раствору фосфатног пуфера чија pH износи 7,2, и филтрирани кроз *Millipore* филтер промера отвора 0,22  $\mu$ m пре употребе. Сви реагенси ће бити набављени од *Sigma Chemicals*.

## 2.7.4 Варијабле које се мере у студији

### *Ћелијска култура*

Потенцијална антитуморска активност комплекса цинка, са дериватима тиосалицилне киселине као лигандима, ће се испитати *in vitro* на туморским ћелијама мишјег карцинома колона СТ26 (ATCC® CRL-2638™) и мишјег меланома В16F1 (ATCC® CRL6323™). Ћелије ће бити одржаване у DMEM (Sigma Aldrich, Munich, Germany) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany), пеницилина (100 IU/mL), стрептомицина (100 µg/mL) у влажној атмосфери 95% ваздуха/ 5% CO<sub>2</sub> на температури од 37°C. Субконфлуентни монослојеви, у фази раста, ће се сакупљати кратким третирањем са 0,25% трипсином и 0,02% EDTA у раствору фосфатног пуфера (PBS, PAA Laboratories GmbH), а након тога испран три пута у серуму без фосфатног пуферског систем. Број вијабилних ћелија ће бити одређиван методом искључивања бојом уз помоћ трипан плавог.

### *Тестови цитотоксичности*

Ефекти тестираних једињења на ћелијску вијабилност ће бити одређивани коришћењем МТТ колориметријског техником. Туморске ћелије које ће бити разблажене у подлози за раст до  $5 \cdot 10^4$  ћелија/mL и аликвоту ( $5 \cdot 10^3$  ћелија/100 mL), а затим се преносе у 96 појединачних бунара. Следећег дана подлога ће бити замењена са 100 µL различитих једињења, који ће серијски бити разблаживани 2 пута на средње концентрације у опсегу од 1000 µM до 7,8 µM у подлози за раста. Свако једињење ће бити тестирано у трипликату. Ћелије ће се инкубирати на 37°C у а 5% CO<sub>2</sub> током 72 h. После инкубације супернатант ће бити уклоњен и 15% раствор МТТ (5 mg/mL in PBS, 10 µL) у DMEM медијуму без FBS ће се додавати у сваки бунарчић. Након 4 сата од инкубације на 37°C у 5% CO<sub>2</sub>, медијум са МТТ ће се уклонити, а DMSO (150 µL) са глицинском пуфером (20 µL) ће се додавати да би се растворили кристали. Плоче се мућкају 10 минута. Оптичка густина сваког бунарчића се одређује на 595 nm коришћењем микроплоча *Zenyth 3100 Multimode detector*. Процент цитотоксичности ће бити израчунат коришћењем формуле:  $\text{цитотоксичност\%} = 100 - ((E-B)/(C-B) \cdot 100)$ , где **Б** се односи на бунаре где је само медијум, **С** означава укупну вијабилност/спонтану смрт нетретираних циљних ћелија, а **Е** се односи на експерименталне бунаре. За сваки од тестираних комплекса ће бити процењивана цитотоксичност у три одвојена експеримента.

### *Анализа ћелијске смрти*

Релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним комплексима испитаће се методом проточне цитометрије ћелија бојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом (PI).

### *Анализа ћелијског циклуса*

Ћелије бојене 30  $\mu\text{g/ml}$  PI у присуству 0.5  $\text{mg/ml}$  RNase у трајању од 30 минута у мраку на собној температуре ће се користити за анализу дистрибуције DNA и анализу ћелијског циклуса.

#### **2.7.5 Снага студије и величина узорка**

Величина узорка је израчуната на основу вредности средње инхибиторне концентрације ( $IC_{50}$ ) испитиваних једињења које су добијене у прелиминарним експериментима. Узорак је израчунат узимајући вредност алфа од 0,05 и снагу студије од 0,8 за Student's t тест (два независна узорка) поредећи групе међу собом применом статистичог програма G\*Power 3. На основу очекиване разлике у испитиваном параметру између група ( $IC_{50}$  на ћелијској линији СТ-26) утврђен је број понављања МТТ теста и он износи 3 за сваку од група.

#### **2.7.6 Статистичка обрада података**

За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 20.

- 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, Фишов 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**

Новосинтетисани комплекси цинка са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине би требало да покажу одређену биолошку активност. Откриће потенцијалне антитуморске активности комплекса цинка је битан предуслов за подстицање даљих истраживања у области координације цинка са лигандима од фармаколошког значаја. Ова проблематика је веома актуелна, што потврђују многе студије које раде на томе да се открију комплекси који ће бити специфичнији према циљаним местима деловања у људском организму. Не само што њихова синтеза потенцијално повећава могућност за проналазак комплекса који имају бољи биолошки ефекат, већ даљим истраживањем постоји шанса да се пронађу комплекси који ће имати шири спектар дејства у медицинској примени са прихватљивим крајњим исходом лечења.



## 2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

У оквиру овог истраживања је предвиђено да се испитају састав и структура добијених једињења, на основу резултата елементалне микроанализе и инфрацрвене спектроскопије. Испитиваће ће се интеракције новосинтетисаних комплекса цинка са СТ-DНК. Одредиће се и механизам ћелијске смрти као и утицај новосинтетисаних комплекса на ћелијски циклус туморских ћелија. Као методе за одређивање наведених параметара користиће се МТТ тест, проточна цитометрија и методе имунофлуоресцентне микроскопије. У анализи прикупљених података користиће се методе дескриптивне статистике и тестирања хипотезе.

## 3. Предлог ментора

За ментора се предлаже проф. др **Иван Јовановић**, ванфедни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија. Предложени наставник 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

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Gajovic N, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocr Relat Cancer* 2018; 25(4):493-507.
2. Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. The Potential of Frog Skin-Derived Peptides for Development into Therapeutically-Valuable Immunomodulatory Agents. *Molecules* 2017; 22(12). pii: E2071.
3. Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Gajovic NM, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. The frog skin host-defense peptide frenatin 2.1S enhances recruitment, activation and tumoricidal capacity of NK cells. *Peptides* 2017; 93:44-50.
4. 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.
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. *Oncology* 2012; 1(2):229-231.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина. Ужа област: Онкологија.

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Проф. др Гордана Радић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан

### **Закључак и предлог комисије**

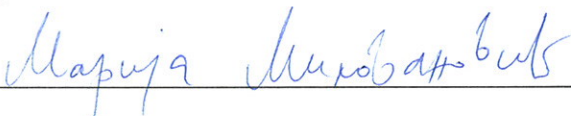
1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Ане Поповић, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

2. Предложена тема је оригинална и научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Резултати ове студије могли би да открију потенцијалне антитуморске активности комплекса цинка, што је битно за подстицање даљих истраживања. Даљим истраживањем повећава се могућност проналажења комплекса који ће имати шири спектар дејства у медицинској примени са прихватљивим крајњим исходом лечења.

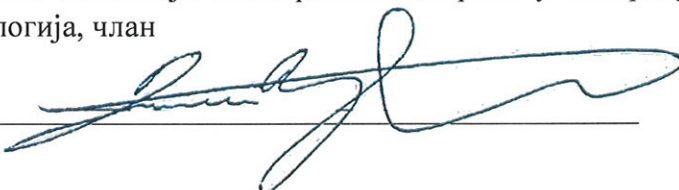
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу, да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Ане Поповић под називом: **„Карактеризација и испитивање антитуморске активности комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине”** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

  
\_\_\_\_\_

2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

  
\_\_\_\_\_

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

  
\_\_\_\_\_

У Крагујевцу, 6. IV 2018.