

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Пријемни број		22-02-18	
Свој ред.	Број	Одбор	Дунавски Г
05	1781/1-		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-1209/22 од 11.01.2018. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Марије Петровић под називом:

“Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*”

Чланови комисије су:

- 1. Проф. др Марко Фолић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник
- 2. НС др сци Сузана Поповић**, научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
- 3. НСВ др сци Александра Ристић Фира**, научни саветник Института за нуклеарне науке “Винча“ Универзитета у Београду, члан

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Марија Петровић 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 Марија Петровић (рођена Радосављевић) рођена је у Крагујевцу 1980. године. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је 1998. године, а потом школовање делом наставила на Медицинском факултету Универзитета у Београду, где је дипломирала 2006. године са просечном оценом 9,00. Последипломске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу на смеру Клиничка и експериментална фармакологија уписала је школске 2006/2007. године. Усмени докторски

испит положила у јуну 2010. године са оценом 9 (девет). Од 2008. године је запослена у Служби за лабораторијску дијагностику Клиничког центра Крагујевац. У октобру 2014. године је положила специјалистички испит из Клиничке биохемије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: “Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*”

Предмет: Комплекси платине(IV) са edda (ethylenediamine-*N,N'*-diacetate) типом лиганда показали су значајну антитуморску активност на већем броју испитиваних ћелијских линија. Предност ових комплекса огледа се у чињеници да су инертнији од комплекса платине(II) и да се могу користити орално. Обзиром на мали број синтетисаних комплексних једињења платине(IV) са edda-типом лиганда, од интереса је испитати *in vitro* антитуморску активност новосинтетисаних комплекса, као и одговор испитиваних туморских ћелија на јонизујуће зрачење примењено самостално или у комбинацији са испитиваним новосинтетисаним комплексима платине(IV).

Хипотезе:

- Комплекси *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate (у даљем тексту комплекс pentil-Pt) и *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl) pentanoate dihydrochloride (у даљем тексту комплекс butil-Pt) смањују вијабилност, пролиферативну активност и клоногено преживљавање туморских ћелија.
- Комплекси pentil-Pt и butil-Pt индукују апоптотску ћелијску смрт туморских ћелија повећавајући релативни однос Вах/Vcl-2 протеина и изазивају фрагментацију молекула ДНК на олигонуклеотидне фрагменте.
- Комплекси pentil-Pt и butil-Pt заустављају ћелијски циклус и утичу на експресију протеина који учествују у његовој регулацији.
- Третман туморских ћелија комплексима pentil-Pt и butil-Pt повећава осетљивост испитиваних туморских ћелија на деловање јонизујућег γ -зрачења и овај ефекат је израженији у односу на ефекат цисплатине.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

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

- **Petrovic M, Todorovic D.** Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. *Facta Universitatis, Medicine and Biology* 2016;18(1):12-8 **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Клиничка употреба цисплатине [*cis*-diamminedichloroplatinum(II)] одобрена је 1978. године. У домену модерне медицине сматра се још увек једним од водећих цитостатика у терапији канцера. Упркос великом успеху у лечењу тумора, цисплатина показује и карактеристичне нежељене ефекте попут нефротоксичности, неуротоксичности и хепатотоксичности. Обзиром да може изазивати и резистенцију код неких врста тумора, синтетисање нових комплекса аналога цисплатине и других прелазних метала који се одликују бољим ефектима, мањом токсичношћу и резистенцијом од цисплатине представља прави изазов у домену нових истраживања. Иако су последњих година испитивани антитуморски ефекти већег броја комплекса платине, тек око 30 комплекса је испитивано у клиничким студијама, а у лечењу тумора се, осим цисплатине, употребљавају још карбоплатина и оксалиплатина који представљају другу генерацију антитуморских комплекса платине(II).

Комплекси платине(IV) се одликују потенцијалом као антитуморски агенси, обзиром да делују цитотоксично на малигне ћелије, док, пак, имају мање нежељених ефеката од цисплатине и других испитиваних комплекса платине(II): инертнији су, а мања фракција лека деактивира се на путу до циљне ћелије. Велики број комплекса платине(IV) је синтетисан уз помоћ различитих лиганата. Променом лиганда мења се липофилност и реактивност једињења. Комплекси платине(IV) су показали цитотоксичну активност на различитим ћелијским линијама хуманих тумора, а само је сатраплатина тренутно у фази клиничког испитивања. Посебно место у досадашњим истраживањима имају комплекси метала са диаминским лигандима, пре свега са лигандима *edda* типа и њиховим дериватима. Студије које се односе на испитивање антитуморске активности ових комплекса показују обећавајуће резултате и указују на оправданост даљих истраживања утемељених на поменутој тематици.

2.5. Значај и циљ истраживања

На основу прелиминарних истраживања антитуморских ефеката новосинтетисаних комплекса платине(IV) и цисплатине на ћелијским линијама хуманих тумора, постављени су следећи конкретни циљеви:

- Пратити раст и одредити време дупликације ћелијских линија хуманих тумора: карцинома дојке (MCF-7), карцинома плућа (A549) и меланома (HTB140)
- Испитати потенцијалну цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине(IV) са лигандима: *pentil*-Pt и *butil*-Pt и упоредити са цитотоксичним ефектима цисплатине на ћелијске линије наведених тумора, као и селективност у њиховом дејству у односу на здраву ћелијску линију фибробласта плућа – MRC-5.

- Испитати утицај комплекса pentil-Pt и butil-Pt на модулацију ћелијских функција односно:
 - На пролиферативну активност ћелија током третмана
 - На експресију протеина који учествују у контроли прогресије ћелијског циклуса
 - На експресију протеина који учествују у регулацији апоптоске смрти
- Одредити радиобиолошке параметре који дефинишу ефикасност јонизујућег γ -зрачења, као и комбинацију γ -зрачења и комплекса pentil-Pt, butil-Pt и цисплатине у елиминацији туморских ћелија.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Појачан интерес за комплексе прелазних метала са лигандима edda-типа и њиховим дериватима јавио се у прошлој деценији када је утврђено да ова једињења имају хидролитичко дејство на молекуле нуклеинских киселина и значајну антитуморску активност на различитим ћелијским линијама карцинома јајника. Ethylenediamine-N,N'-diacetate (edda) је тетрадентатни лиганд који поседује по два донорска атома азота и кисеоника. Из овог молекула изведен је велики број лиганата (eddp, eddip, (S,S)eddp, eddl, eddch и други). Комплекси платине(IV) са edda-типом лиганата су показали антитуморску активност *in vitro*. У зависности од типа ћелија, њихова антитуморска активност је мања, већа или скоро иста у односу на цисплатину. Све ово наводи истраживаче широм света да синтетишу и испитују једињења која би могла постати бољи цитостатици у смислу активности и селективности према малигним ћелијама са што је могуће мање негативних ефеката.

Комбиновани третмани малигнух тумора хемиотерапеутицима и конвенционалним, јонизујућим зрачењем представљају веома интересантно поље истраживања, обзиром и на контрадикторност добијених резултата: цисплатина код неких тумора (плућа, врата и главе) делује као радиосензитизатор, док код других тумора нема радиосензитизаторску активност или изазива изражене симптоме токсичности код пацијената. Претпоставља се да цисплатина инхибира механизме који исправљају оштећења на молекулу ДНК индукована јонизујућим зрачењем, али тачан механизам деловања још увек није у потпуности разјашњен.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

2.7.2. Популација која се истражује

За потребе истраживања користиће се туморске ћелијске линије различитог порекла и инвазивности: ћелијска линија карцинома дојке (MCF-7), ћелијска линија карцинома

плућа (A549) и ћелијска линија малигног меланома (HTB140). Као здрава контрола користиће се ћелијска линија фибробласта (MRC-5).

2.7.3. Методе

- Раст туморских ћелија у култури биће праћен до девог дана од засејавања, а вијабилност ћелија одређиваће се на сваких 24 часа применом метилтетразолијум (МТТ) теста. На тај начин ће се одредити време дупликације ћелија и изабрати одговарајуће временске тачке за третмане комплексима платине.
- Дејство комплекса pentil-Pt и butil-Pt на вијабилност туморских ћелија и здравих фибробласта одређиваће се након 6, 24 и 48 часова од третмана различитим концентрацијама испитиваних комплекса применом МТТ и сулфородамин В (SRB) теста. Сви резултати биће упоређени са ефектима цисплатине. На основу резултата МТТ и SRB теста одредиће се вредности IC50, као и индекс селективности (SI).
- Сва даља истраживања биће урађена на ћелијским линијама код којих је вредност IC50 нижа од 100 μ M, концентрацијом која одговара управо вредностима IC50 за ту ћелијску линију.
- Ефекти испитиваних супстанци на пролиферативну активност туморских ћелија биће одређени применом теста инкорпорације бром-деоксиуридина (BrdU) у молекула ДНК током процеса репликације. Тест ће се урадити помоћу комерцијалног комплета, а у складу са упутством произвођача.
- Преживљавање третираних туморских ћелија испитиваним комплексима платине биће одређено 7-10 дана након третмана, клоногеним есејом. На основу тако добијених података биће одређене вредности ефикасности засејавања (PE) и фракције преживљавања (SF).
- Промене на молекулу ДНК које су карактеристичне за процес апоптозе биће детектоване на узорцима геномске ДНК изоловане из туморских ћелија након третмана различитим концентрацијама испитиваних супстанци тзв. ДНК "ladder" методом. Геномска ДНК биће анализирана техником електрофоретског раздвајања фрагмената ДНК на 2% агарозном гелу.
- Квантификација апоптотичних ћелија биће урађена методом проточне цитометрије ћелија обојених Анпехип-ом V и 7-AAD. На основу тако добијених података биће одређене и вредности апоптотског индекса.
- Промене на нивоу ДНК које настају после третмана ћелија испитиваним супстанцама, а које се директно одражавају на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса, биће праћене на проточном цитометру, након третирања ћелија пропидијум јодидом.
- Да би потврдили и употпунили добијене резултате, биће анализиран ниво експресије протеина Вах и Bcl-2, као и протеина који учествују у регулацији

ћелијског циклуса (циклина и p21), у ћелијским екстрактима добијеним лизирањем третираних туморских ћелија и електрофоретским раздвајањем протеина методом полиакриламид гел електрофорезе у присуству детергента натријум додецил сулфата (SDS-PAGE). Узорци ће бити анализирани помоћу имуно-блот методе (Western blotting), а сигнал ће бити детектован помоћу ауторадиографског филма.

- Ћелије ће бити третиране дозом од 2 Gy γ -зрачења, као и комбинацијом појединачних комплекса pentil-P, butil-Pt и цисплатине и одговарајуће дозе γ -зрачења. Ћелије ће бити озрачене на собној температури појединачним дозама од 2 Gy при брзини дозе од око 1 Gy/min на ^{60}Co извору у Институту за нуклеарне науке „Винча” у Београду. Резултати клоногеног есеја ће нам омогућити израчунавање радиобиолошких параметара који указују на повећање осетљивости туморских ћелија на јонизујуће зрачење после третмана комплексима pentil-Pt, butil-Pt и цисплатине.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле студије (узрок) представљаће примењени комплекси pentil-Pt и butil-Pt, а зависне варијабле (исход) представљаће вредности мерених параметара од интереса.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун студијског узорка је заснован на публикованим истраживањима из ове области (5). Укупна величина узорка је израчуната узимајући алфа грешку од 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Studentov t* тест (два независна узорка) упоређујући групе између себе (у оба смера), према статистичком програму G power 3 и износи 24. Укупна величина узорка ће бити увећана у складу са методолошким упутствима у овој области која препоручују испитивање потенцијалног цитотоксичног агенса коришћењем сваке концентрације у трипликату. Истраживања ће имати три независна поновљена експеримента.

2.7.6. Статистичка анализа

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности помоћу *Kolmogorov-Smirnov* или *Shapiro-Wilk* теста. За тестирање хипотезе средњих вредности континуалних варијабли које имају нормалну расподелу користиће се *Studentov t* – тест, независни *t* – тест, упарени *t* – тест, односно *ANOVA*, док ће за поређење варијабли који немају правилну расподелу користити *Mann-Whitney*, *One-Sample Kolmogorov Smirnov*, *Wilcoxon* тест и *Kruskal-Wallis* тест. Разлика у компарираним подацима ће се сматрати статистички значајном уколико је вероватноћа нулте хипотезе мања од 5% ($p < 0,05$), односно веома значајном уколико је вероватноћа нулте хипотезе мања од 1%

($p < 0,01$). Резултати експеримената ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна грешка (SEM) и биће приказани табеларно и графички.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће резултати ових истраживања показати потенцијалну антитуморску активност новосинтетисаних комплекса платине(IV) на испитиваним ћелијским линијама. Анализа добијених резултата омогућиће боље разумевање интраћелијских сигналних путева који се активирају у малигно трансформисаним ћелијама при третману новосинтетисаним комплексима платине(IV). Такође, указаће и на утицај испитиваних комплекса на радиоосетљивост малигну ћелија, односно на могућу примену комплекса платине(IV) у конвенционалном третману малигну тумора хемотерапеутицима и јонизујућим зрачењем.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Комплекси платине(IV) имају потенцијал као антитуморски агенси, обзиром да делују цитотоксично на малигне ћелије, а имају мање нежељених ефеката од цисплатине и других испитиваних комплекса платине(II). Основни циљ овог истраживања је да се испита директно цитотоксично дејство, као и потенцијални механизам деловања новосинтетисаних комплекса платине(IV): *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N*-di-2-propenoate dihydrochloride dihydrate и *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N*-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride на више ћелијских линија хуманих тумора, као и диференцијална цитотоксичност у односу на нормалне ћелије. Испитаће се и ефекти комплекса на радиоосетљивост туморских ћелија након комбинованих третмана комплексима платине(IV) и γ -зрачењем. Резултати ће бити упоређени са ефектима цисплатине. Користиће се ћелијске линије хуманих карцинома плућа (A549), карцинома дојке (MCF-7) и меланома (HTB140), као и култура фибробласта MRC-5 (здраве контролне ћелије). Одређиваће се цитотоксично дејство новосинтетисаних комплекса након 6, 24 и 48 часова од третмана различитим концентрацијама комплекса у односу на нетретираних ћелије MTT и SRB тестом, као и пролиферативна активност мерењем инкорпорације бромдеоксиуридина у молекул ДНК третираних ћелија. Клоногени есеј ће нам дати информацију о преживљавању ћелија 7-10 дана након третмана. Утврдиће се и тип ћелијске смрти анализом геномске ДНК изоловане из третираних ћелија, као и квантификација процеса апоптозе и анализа ћелијског циклуса методом проточне цитометрије. Испитиваће се и експресија и активност протеина укључених у индукцију апоптозе и регулацију ћелијског циклуса туморских ћелија Western-blot анализом. Утицај на осетљивост туморских ћелија на јонизујуће зрачење биће одређен помоћу клоногеног есеја после комбинованог третмана ћелија новосинтетисаним комплексима платине и γ -зрачењем, одређивањем одговарајућих радиобиолошких параметара (SF2, SER, RBE). Ово

истраживање ће показати да ли новосинтетисани комплекси pentil-Pt и butil-Pt показују боље ефекте и мању токсичност од цисплатине. Добијени резултати ће бити од посебног значаја у домену релевантног објашњења на које молекуле и функције у ћелији делују испитивани комплекси. Такође, резултати предложених истраживања би указали на оправданост даљих испитивања комплекса pentil-Pt и butil-Pt као потенцијалних терапеутика.

3. Предлог ментора

За ментора докторске дисертације под називом “Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*” кандидата др Марије Петровић предлаже се доц. др Данијела Тодоровић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика. Доц. др Данијела Тодоровић поседује стручне и научне квалификације у складу са предметом истраживања и планираним методолошким приступом 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

Релевантне референце доц. др Данијеле Тодоровић из области теме докторске дисертације:

1. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, Todorovic D, Djurdjevic P, Zaric M, Stankovic M, Todorovic M, Avramovic D, Popovic S. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *J Ethnopharmacol*, 2016;190:362-371.
2. Cocic D, Jovanovic S, Nisavic MR, Baskic DD, Todorovic DV, Popovic SLj, Bugarcic ZD, Petrovic BV. New dinuclear palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *Journal of inorganic biochemistry*, 2017;175:67-79.
3. Stojković DLj, Jevtić VV, Radić GP, Todorović DV, Petrović M, Zarić M, Nikolić I, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid. *J Inorg Biochem* 2015; 143:111-116.
4. Keta OD, Todorovic DV, Bulat TM, Cirrone P, Romano F, Cuttone G, Petrovic IM, Ristic-Fira AM. Comparison of human lung cancer cell radiosensitivity after irradiations with therapeutic protons and carbon ions. *Experimental biology and medicine*, 2017; 242(10):1015-1024.
5. Zakula JJ, Koricanac LB, Keta OD, Todorovic DV, Cirrone G, Romano F, Cuttone G, Petrovic IM, Ristic-Fira AM. Carbon ions of different linear energy transfer (LET) values

- induce apoptosis and G2 cell cycle arrest in radio-resistant melanoma cells. Indian journal of medical research, 2016; 143:120-128.
6. Ristić-Fira A, Todorović D, Zakula J, Keta O, Cirrone P, Cuttone G, Petrović I. Response of human HTB140 melanoma cells to conventional radiation and hadrons. *Physiol Res* 2011; 60(1):S129-135.
 7. Petrović I, Ristić-Fira A, Todorović D, Korićanac L, Valastro L, Cirrone P and Cuttone G. Response of a radioresistant human melanoma cell line along the proton spread-out Bragg peak. *Int J Radiat Biol* 2010; 86(9):742–751.
 8. Todorović D, Petrović I, Todorović M, Cuttone G, Ristić-Fira A. Early effects of gamma rays and protons on human melanoma cell viability and morphology. *Journal of Microscopy*, 2008; 232(3):395-399.
 9. Petrović IM, Korićanac LB, Todorović DV, Ristić-Fira AM, Valastro LM, Privitera G, Cuttone G. Viability of a human melanoma cell after single and combined treatment with fotemustine, dacarbazine and proton irradiation. *Ann NY Acad Sci*, 2007; 1095:154-164.
 10. Ristić-Fira AM, Todorović DV, Korićanac LB, Petrović IM, Valastro LM, Cirrone P, Raffaele L, Cuttone G. Response of a human melanoma cell line to low and high ionising radiation. *Ann NY Acad Sci Ann*, 2007; 1095:165-174.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална фармакологија

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Марко Фолић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник
2. НС др сци Сузана Поповић, научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. НСВ др сци Александра Ристић Фира, научни саветник Института за нуклеарне науке “Винча“ Универзитета у Београду, члан

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, др Марија Петровић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је прецизна и јасна.

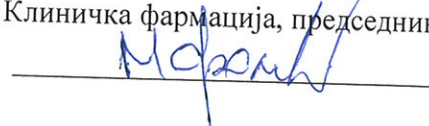
Комисија сматра да ће предложена докторска дисертација др Марије Петровић бити од великог значаја у погледу како верификације потенцијалне антитуморске активности од интереса и механизма дејства новосинтетисаних комплекса платине(IV), тако и креирању стратегија у домену даљих испитивања комплекса pentil-Pt и butil-Pt као потенцијалних терапеутика.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Марије Петровић под називом **“Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигних тумора *in vitro*”** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

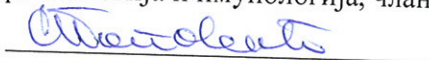
Проф. др Марко Фолић

Ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Клиничка фармација, председник



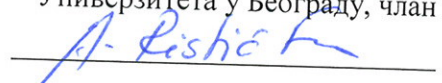
НС др сци Сузана Поповић

Научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан



НСВ др сци Александра Ристић Фира

Научни саветник Института за нуклеарне науке “Винча“
Универзитета у Београду, члан



У Крагујевцу,
16.01.2018. године