

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-12209/3-3, од 25. 11. 2015. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата *mr pharm* Исидоре Стојић, под називом:

„Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидациони стрес изолованог срца пацова“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Живадин Бугарчић**, председник, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија,
2. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија.

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

Магистар фармације Исидода Стојић рођена је 22. 11. 1987. године у Пећи. Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“, смер фармацеутски техничар, завршила је у Крагујевцу 2006. године. Након завршене средње школе, уписала је Медицински факултет у Крагујевцу – Одсек фармација и исти завршила 2011. године са просечном оценом 9.26. Уписала је докторске академске студије на Медицинском факултету, Универзитет у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина - подподручје Клиничка и експериментална фармакологија, школске 2011/2012 године.

Запослена на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу од 2012. године. Тренутно је у зваљу асистента за ужу научну област фармацеутска биотехнологија. Активно се бави научно-истраживачким радом у лабораторији за кардиоваскуларну физиологију.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидациони стрес изолованог срца пацова“

Предмет: Утицај различитих комплекса платине на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова

Хипотеза: Акутна апликација Pt(II)-комплекса: 1,2-диамино-циклохексан-дихлоро-платината (II) ($Pt^{(II)}ENCl_2$), етилен-диамин-дихлоро-платината (II) ($Pt^{(II)}DACHCl_2$), терпиридин-дихлоро-платината (II) ($Pt^{(II)}TERPYCl_2$) и цисплатине (CDDP), може изазвати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у рецензираном часопису, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Stojic I, Novkmet S, Zivkovic V, Srejavic I, Jeremic N, Jakovljevic V, Djuric D. The effects of cisplatin and its Pt(II) analog on oxidative stress in isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/SJECR-2015-0050 **M52=1.5 бод**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Велики број племенитих метала у облику комплексних једињења се користе у савременој медицини јер испољавају различита фармаколошка дејства. Употреба металофармацеутика је започета открићем цисплатине, потентног антитуморског агенса, који се користи за лечење карцинома тестиса, оваријума, мокраћне бешике, плућа као и лечење карцинома који су резистенти према другим цитостатикима. Након што комплекси платине доспеју у ћелије они отпуштају одлазеће лиганде (јоне хлора) и везују молекуле воде при чему настају позитивно наелектрисани молекули који даље интерагују са нуклеофилним молекулима као што су ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина), РНК (рибонуклеинска киселина) и протеини. Антитуморску активност ови комплекси остварују везивањем за молекул ДНК (N7 атом имидазоловог прстена аденозина или гуанозина) при чему спречавају транскрипцију а тиме и репликацију молекула ДНК, што условљава програмирану ћелијску смрт. Главни проблем код употребе цисплатине у терапији је то што свега 1% од примењене дозе доспе до циљног органа због великог афинитета везивања цисплатине (мека киселина) за тиолне биомолекуле (меке базе) присутне у плазми и ћелијама. Због наведене неселективности цисплатине настаје системска токсичност и до сада су детаљније описане: неуротоксичност, ототоксичност, нефротоксичност, кардиотоксичност. Поред описаних токсичности проблем приликом употребе цисплатине представља појава резистенције након поновљених циклуса терапије што условљава губитак активности. Оксидациони стрес је укључен у патогенезу свих врста токсичности и огледа се у повећаној продукцији супероксид анјон радикала, водоник пероксида и хидрокси радикала и смањењу продукцији антиоксидационих молекула.

Цисплатина након акутне примене може изазвати инфаркт миокарда и вентрикуларне аритмије, што указује на то да може довести до развоја коронарних болести. Такође, утиче на срчану контрактилност доводећи до депресије контрактилности миокарда која је највероватније повезана са оштећењем митохондрија и настанком оксидационог стреса.

У циљу превазилажења свих ових проблема извршена је синтеза и испитивање великог броја комплекса платине (аналога цисплатине) у правцу постизања исте или веће

активности али уз мању појаву нежељених ефеката и избегавање резистенције. Изменом структуре комплекса платине мења се њихова хемијска реактивност, растворљивост, фармакокинетички профил као и токсичност. Комплекси $Pt(II)$ (двовалентне платине) са 1,2-диаминоциклохексаном (1,2-*dach* или *dach*) као лигандом показали су антитуморску активност на ћелијским линијама, са терапијским индексом који се може поредити са цисплатином (6,9 vs. 8,1). Такође, показано је да повећава преузимање лека у ћелију и спречава поправку молекула ДНК за које се комплекс платине везао.

До сада је само један аналог показао предност у односу на цисплатину у погледу нефротоксичности, али поседује нижу активност. Цисплатина је и даље водећи металофармацеутик у „рату против тумора“ док истраживања у правцу извођења бољег аналога још увек трају.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Имајући у виду да се једињења платине користе у медицини као антитуморски агенси, да је доказана њихова клиничка успешности (стопа излечења преко 90 одсто у случају карцинома тестиса), као и на регистроване недостатке: појаву резистенције, тешка нежељена дејства и токсичност (неуротоксичност, ототоксичност, нефротоксичност, кардиотоксичност) извршене су промене у структури цисплатине, што је резуловало појавом карбоплатине, оксалилплатине и недаплатине. Ови комплекси показали су антитуморску активности према оним ћелијама тумора које су резистенте у односу на цисплатину као и смањену нефротоксичност и мијелотоксичност.

С друге стране, улога оксидационог стреса у патогенези преко двеста акутних и хроничних болести (међу њима и многих кардиоваскуларних обољења) је до сада већ добро позната. Ипак међусобна интеракција оксидационог стреса у ефектима комплекса платине, као доказаних и потенцијалних цитостатика на кардиоваскуларни систем није скоро уопште испитивана.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је да се евалуирају ефекти акутне администрације $Pt(II)$ -комплекса: 1,2-диамино-циклохексан-дихлоро-платината (II) ($Pt^{(II)}ENCl_2$), етилен-диамин-дихлоро-платината (II) ($Pt^{(II)}DACHCl_2$), терпиридин-дихлоро-платината (II) ($Pt^{(II)}TERPYCl_2$) и цисплатине (*CDDP*), на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Велики број племенитих метала у облику комплексних једињења се користе у савременој медицини јер испољавају различита фармаколошка дејства. Употреба металофармацеутика је започета открићем цисплатине, потентног антитуморског агенса, који се користи за лечење карцинома тестиса, оваријума, мокраћне бешике, плућа као и лечење карцинома који су резистенти према другим цитостатикима. Након што комплекси платине доспеју у ћелије они отпуштају одлазеће лиганде (јоне хлора) и везују молекуле воде при чему настају позитивно наелектрисани молекули који даље интерагују са нуклеофилним молекулима као што су ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина), РНК

(рибонуклеинска киселина) и протеини. Антитуморску активност ови комплекси остварују везивањем за молекулу ДНК ($N7$ атом имидазоловог прстена аденозина или гуанозина) при чему спречавају транскрипцију а тиме и репликацију молекула ДНК, што условљава програмирану ћелијску смрт. Главни проблем код употребе цисплатине у терапији је то што свега 1% од примењене дозе доспе до циљног органа због великог афинитета везивања цисплатине (мека киселина) за тиолне биомолекуле (меке базе) присутне у плазми и ћелијама. Због наведене неселективности цисплатине настаје системска токсичност и до сада су детаљније описане: неуротоксичност, ототоксичност, нефротоксичност, кардиотоксичност. Поред описаних токсичности проблем приликом употребе цисплатине представља појава резистенције након поновљених циклуса терапије што условљава губитак активности. Оксидациони стрес је укључен у патогенезу свих врста токсичности и огледа се у повећаној продукцији супероксид анјон радикала, водоник пероксида и хидрокси радикала и смањењој продукцији антиоксидационих молекула.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 91 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 г) којима би се изоловало срце и перфундовало методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од $70 \text{ cmH}_2\text{O}$. Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципима етике.

Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета Медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу.

Материјал и методе

Животиње би биле груписане у пет (5) експерименталних група (свака од експерименталних група, изузев контролне групе, би биле подељена на три (3) подгрупе (по 6 животиња у свакој подгрупи): 1) перфузија Кребс-Хенселејтовим раствором (контролна група), 2) акутна апликација 1,2-диамино-циклохексан-дихлоро-платината (II), 3) акутна апликација етилен-диамин-дихлоро-платината (II), 4) акутна апликација терпиридин-дихлоро-платината (II), 5) акутна апликација цисплатине

Свака од експерименталних група је подељена на три подгрупе у зависности од концентрације комплекса којом ће се једнократно перфундовати изолована срца 10^{-5}M , 10^{-6}M и 10^{-7}M .

Жртвованим животињама би се изоловало срце и перфундовало испитиваним комплексима према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по *Langendorff*-у. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацавање сензора (*transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе: $dp/dt \text{ max}$ - максимална стопа промене притиска у левој комори, $dp/dt \text{ min}$ - минимална стопа промене притиска у левој комори, SLVP - систолни притисак леве коморе, DLVP - дијастолни притисак леве коморе,

HR - срчана фреквенца. Функција миокарда ће се испитивати при константном перфузионом притиску од 70 cmH₂O. Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала протонометријски (флоуметријски).

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, у току перфузије комплексом, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у облику нитрита (NO₂⁻), супероксид анјон радикал (O₂⁻), водоник пероксид (H₂O₂).

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима (25,26). За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 91 (по 6 у свакој групи).

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*: 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, за испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*, за тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов *t*-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

Полазећи од претходно наведених чињеница о токсичности молекула цисплатине са посебним освртом на његову способност изазивања акутне кардиотоксичности потенцијални значај ове студије би био откривање других Pt(II)-комплекса који би показали мању кардиотоксичност. Сматра се да су потенцијални механизми настанка кардиотоксичности, настале употребом цисплатине, оксидативни стрес и апоптоза. Долази до "цурења" лактат-деhidрогеназе и креатин-киназе из миоцита услед липидне пероксидације мембрана. У овом истраживању бисмо испитивали утицај четири различита акутно апликована Pt(II)-комплекса (укључујући и цисплатину) на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Још један од циљева овог истраживања био би откривање потенцијалне улоге оксидационог стреса у механизму настанка токсичних ефеката. Сходно томе да се ови комплекси разликују по структури неодлазећих лигананда који утичу на специфичност везивања комплекса платине за молекуле ДНК и тиолне биомолекуле очекујемо различите ефекте на контрактилност као и на њихову способност изазивања оксидационог стреса. Анализирањем хистолошких препарата срца добијених из експеримената очекујемо да ћемо моћи да разјаснимо потенцијални механизам настанка кардиотоксичности након акутне администрације поменутих комплекса на изоловано срце пацова, пре свега утврђивањем да ли постоји везивање јона Pt²⁺ за срчано ткиво. Имајући у виду да ћемо сваки од комплекса примењивати у три различите дозе, 10⁻⁵М, 10⁻⁶М и 10⁻⁷М, моћи ћемо и да анализирамо да ли постоји дозно зависни ефекат примењених комплекса платине на поменуте параметаре.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Ограничена примена цисплатине и других регистрованих комплекса платине, који се користе као антитимурски лекови, због појаве великог броја нежељених дејстава, резистетности и високе токсичности отворили су могућност истраживања у правцу синтезе нових једињења платине са истом или већом ефикасношћу и смањеном токсичношћу.

Резултати ове студије ће помоћи у разумевању ефеката које различити Pt(II)-комплекси (укључујући и цисплатину као референтну супстанцу) остварују на функцију кардиоваскуларног система и расветљавању потенцијалне улоге оксидационог стреса у механизму настанка токсичних ефеката на нивоу кардиоваскуларног система.

Узимајући у обзир све претходно наведено, резултати овог истраживања би могли да дају допринос даљим истраживањима у правцу синтезе, испитивања и примене нових Pt(II)-комплекса (аналога цисплатине) у хемијотерапији.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Слободан Новокмет**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Експериментална физиологија и фармакологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Живадин Бугарчић**, председник, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија,
2. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Исидора Стојић, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да развије нов приступ изучавању потенцијалне примене нових комплекса платине у лечењу малигних болести, са посебним освртом на испитивање њихове потенцијалне кардитоксичности.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза Исидоре Стојић бити од великог научног и практичног значаја у смислу проучавања и примене нових комплекса платине у лечењу малигних болести.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Исидоре Стојић под називом „**Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

Проф. др Владимир Јаковљевић, члан, редовни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Физиологија

Проф. др Драган Ђурић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија

У Крагујевцу, 30. 11. 2015.