

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО: 20.07.17			
Орг.јед.	Број	Прилог	Вредност
05	8954/3-1		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-689/37 од 05.07.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Катарине Радоњић** под називом:

“Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине и Ru(II) комплекса на изоловано срце и оксидациони стрес пацова“

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

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;
3. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Опита и неорганска хемија*, члан;

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Катарина Радоњић** 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

Мг рh Катарина Радоњић (рођ. Михајловић) рођена је 17.05.1987. године у Краљеву. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је школске 2006/2007. године, а завршила их на истом факултету 11.07.2011. године са просечном оценом 9,51 (девет и 51/100), чиме је стекла стручно звање магистар фармације. Након обављеног приправничког стажа положила је стручни испит у децембру 2012. године.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина- подручје Клиничка и експериментална фармакологија, уписала је школске 2011/2012. године. Положила је све испите предвиђене планом и програмом студијског програма са просечном оценом 9,50 (девет и 50/100). Усмени докторски испит положила је 16.10.2015. године оценом 9 (девет).

Од 27.02.2013. године запослена је на Факултету медицинских наука најпре као сарадник у настави, а потом као асистент за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија. Од октобра 2015. године активно учествује у истраживачком раду у Лабораторији за физиологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине и Ru(II) комплекса на изоловано срце и оксидациони стрес пацова“

Предмет: Испитивање и поређење ефеката хроничне примене цисплатине и Ru(II) комплекса на кардиодинамске параметре изолованог срца пацова, ретроградно перфундованог по Лангендорфовој техници, као и испитивање ефеката примене наведених супстанци на промене у вредностима биохемијских маркера (ниво укупних липида и холестерола, урее и креатинина, укупних протеина и албумина, трансминаза (AST и ALT), срчаног тропонина (сTnT), лактат дехидрогеназе (LDH) и креатин киназе (СК и СК-МВ)) и биомаркера оксидационог стреса и ензима антиоксидационе заштите.

Хипотезе: У поређењу са цисплатином, хронична примена Ru(II) комплекса: [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl], [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] и [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] може имати мање штетно дејство на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Поред тога очекује се да комплекси рутенијума изазову мању продукцију слободних радикала и остваре слабији кардиотоксични ефекат.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Катарина Радоњић, је објавила рад у целини у часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Radonjic K**, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Jakovljevic V, Djuric D, Novokmet S. The platinum (II) complexes induced oxidative stress of isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res 2017; 18(2):111-7. **M52**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Откриће цисплатине (CDDP) је довело до интересовања за клиничку примену комплекса прелазних метала као потенцијалних антитуморских лекова. Упркос изванредном клиничком успеху, лечење цисплатином је ограничено због резистенције и озбиљних нежељених дејстава (нефротоксичност, кардиотоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, периферна неуропатија и др.).

Прегледом литературе установљено је да након акутне и хроничне примене цисплатине може настати кардиотоксичност која се манифестује у виду поремећаја срчане контрактилности, аритмија, инфаркта миокарда и кардиомиопатије. Наведене промене у раду срца најчешће су повезане са оштећењем митохондрија до којег долази због акумулирања цисплатине у кардиомиоцитима. Цисплатина потом индукује повећање нивоа слободних радикала, док се истовремено снижава ниво ензима антиоксидационе заштите (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза). Настанак оксидационог стреса и прекомерно ослобађање реактивних кисеоничних врста (ROS) изазива апоптозу кардиомиоцита и ендотелних ћелија, најчешће преко повећања експресије проапоптотског гена Вах и ензима каспазе 3 и смањења експресије антиапоптотског гена Bcl-2.

2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду фреквентност употребе цисплатине као хемиотерапијског агенса у различитим протоколима лечења малигних болести, као и отпорност појединих малигних тумора и нежељене ефекте примене ове терапије, разумљива је тежња ка развоју нових хемиотерапеутика који би имали већи антитуморски потенцијал, а мање изражене нежељене ефекте. Ово истраживање може да допринесе глобалнијем сагледавању ефеката примене Ru(II) комплекса у погледу кардиотоксичности, што је једно од кључних ограничења примене цисплатине.

Општи циљ овог истраживања је испитивање ефеката хроничне примене цисплатине (CDDP) и Ru(II) комплекса: [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl], [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] и [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.

У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитати утицај хроничне примене цисплатине (CDDP) и Ru(II) комплекса: [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl], [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] и [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] на оксидациони стрес путем испитивања различитих параметара оксидационог стреса: азот моноксид (NO мереног у облику нитрита (NO₂⁻)), супероксид анјон радикала (O₂⁻), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и водоник пероксида (H₂O₂), као и ензима антиоксидационе заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза (GP_x) и компоненте: редуковани глутатион (GSH), оксидовани глутатион (GSSG), као и однос оксидованог и редукованог глутатиона GSSG/GSH;
2. Утврдити корелацију између добијених кардиодинамских ефеката цисплатине и примењених комплекса рутенијума, као и вредности поменутих маркера оксидационог стреса;
3. Испитати утицај примењених супстанци на вредности: укупних липида и холестерола, трансаминаза (AST и ALT), урее и креатинина, укупних протеина и албумина, срчаног тропонина Т (сTnT), као и ензима лактат дехидрогеназе (LDH) и креатин киназе (СК и СК-МВ).;
4. Испитати утицај примењених супстанци на поремећај експресије гена укључених у апоптозу кардиомиоцита у срчаном ткиву: Bcl-2, Вах и каспазе 3.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Последњих неколико деценија синтетисан је велики број комплекса прелазних метала који су испитани *in vitro* и *in vivo* са циљем проналаска металофармацеутика који би имали мању токсичност и исту или већу потентност. Највеће интересовање научника тренутно је усмерено ка синтези и испитивању потенцијалне антитуморске активности и токсичности органометалних комплекса рутенијума.

Комплекси рутенијума Ru(II/III) су показали значајну антитуморску и антиметастатску активност према различитим туморима, нарочито оним који су резистентни на дејство цисплатине. Предности комплекса рутенијума у односу на цисплатину огледају се у смањеној токсичности, доброј селективности према туморима и инхибицији прогресије метастаза. Уочено је и да су многи комплекси рутенијума добро растворљиви у води што је значајно за терапијску примену, јер испољавају изузетну стабилност у биолошком окружењу и интерагују са различитим биолошким метама.

Комплекси Ru(II) са етилендиамином, 1,2-диаминоциклохексаном и бипиридином као лигандима, $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$, $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$ недавно су испитивани на хуманим и мишијим ћелијским линијама тумора колона и плућа са циљем утврђивања потенцијалне цитотоксичне активности. Резултати ових истраживања су охрабрујући јер су указали на њихову умерену антитуморску активност. Ипак, још увек је непозната њихова *in vivo* токсичност након хроничне примене, као и ефекти на функцију срца и коронарну циркулацију.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија на животињама и материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*.

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 60 пацова *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 30 g. Експерименталне животиње ће бити чуване у

строго контролисаним условима (температура $23 \pm 1^\circ\text{C}$, циклус светлости:тама 12:12 часова), док ће вода и храна бити доступни у довољној количини да би могле да их узимају према потреби (*ad libitum*).

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 предат Етичкој комисији за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

2.7.3. Узорковање

Животиње ће бити подељене у пет (5) експерименталних група, у свакој по 12 животиња. Три експерименталне групе ће четири недеље интраперитонеално (и.п.) примати појединачну дозу испитиваних комплекса (4 mg/kg телесне масе) једном недељно, док су остале две групе контролне и четири недеље ће и.п. примати једном недељно физиолошки раствор (прва група) и цисплатину (4 mg/kg телесне масе) растворену у физиолошком раствору (друга група).

- 1) контролна група- физиолошки раствор (4 ml/kg телесне масе) и.п.
- 2) контролна група- цисплатина растворена у физиолошком раствору (4 mg/kg телесне масе) и.п.
- 3) $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (4 mg/kg телесне масе) и.п.
- 4) $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (4 mg/kg телесне масе) и.п.
- 5) $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (4 mg/kg телесне масе) и.п.

Укупан број експерименталних животиња је 60 (по 12 у свакој групи).

2.7.4. Варијабле

Након завршеног експерименталног протокола животиње ће се жртвовати да би се спровела испитивања на изолованом срцу, односно испитала функција миокарда и коронарна ауторегулација. Жртвовање животиња ће се спровести на начин којим се избегава патња експерименталних животиња, а у сагласности са релевантном директивом. Изоловано срце ће се перфундовати према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd*,

1062 Budapest, Hungary). Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацивање сензора (*transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе:

- а) $dp/dt \max$ - максимална стопа промене притиска у левој комори,
- б) $dp/dt \min$ - минимална стопа промене притиска у левој комори,
- в) SLVP - систолни притисак леве коморе,
- г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе,
- д) HR - срчана фреквенца.

Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала флоуметријски. Функција миокарда и коронарна ауторегулација ће се испитивати при промени перфузионог притиска, почев од притиска од 40 cmH₂O, 60 cmH₂O, 80 cmH₂O, 100 cmH₂O, 120 cmH₂O, док ће се за сваку вредност перфузионог притиска регистровати параметри функције леве коморе и одређивати коронарни проток.

У тренутку жртвовања животиње применом гиљотине, животињи ће се узимати крв искрвављењем. Из узете крви ће се издвајати плазма, серум и еритроцити. У серуму ће се помоћу стандардног анализатора одређивати концентрација:

- 1) укупних липида и холестерола
- 2) трансаминаза (AST и ALT)
- 3) укупних протеина и албумина
- 4) урее и креатинина
- 5) срчаног тропонина Т (cTnT)
- 6) лактат дехидрогеназе (LDH) и креатин киназе (СК и СК-МВ).

Уједно, приликом жртвовања животиња прикупиће се узорци крви за процену системског редокс статуса, путем мерења концентрације у плазми прооксидационих параметара спектофотометријском методом: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻), супероксид анјон радикал (O₂⁻), водоник пероксид (H₂O₂), као и ензима антиоксидационе заштите из еритроцита: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза (GP_x) и компоненте: редуковани глутатион (GSH), оксидовани глутатион (GSSG) и однос оксидованог и редукованог глутатиона GSSG/GSH.

Поред тога, у прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента током перфузије, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери срчаног оксидационог стреса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS
2. азот моноксид у облику нитрита (NO_2^-)
3. супероксид анјон радикал (O_2^-)
4. водоник пероксид (H_2O_2).

Током трајања експеримента животињама ће се једном недељно мерити и телесна маса због бележења евентуалних промена.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима. 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 статистичког програма *G*Power3*. Узимајући у обзир резултате ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 50 (по 10 у свакој групи). Због могућности искључења неких животиња из студије (услед смрти), укупан број животиња биће 60 (по 12 у свакој групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата биће коришћен статистички програм *SPSS 21.0 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

Истраживања са Ru(II) и Ru(III) комплексима у последње две деценије указала су на њихов цитотоксични и антиметастатски потенцијал према солидним туморима резистентним на примену цисплатине. С обзиром на потенцијалну терапијску примену ових комплекса, од несумњивог интереса је и испитивање њихових штетних ефеката, поготово кардиотоксичности. Очекује се да у поређењу са цисплатином, хронична примена комплекса Ru(II) покаже мање штетне ефекте на контрактилност и кардиодинамске параметре изолованог срца пацова, вредности маркера оксидационог стреса и биохемијских параметара.

Значај ове студије огледао би се у бољем разумевању основних механизма токсичних ефеката Ru(II) комплекса и даљим смерницама за дизајн и синтезу металофармацеутика са већом ефикасношћу према туморима и нижом токсичношћу.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Циљ овог истраживања је да испита и упореди ефекте хроничне примене цисплатине и комплекса Ru(II) на кардиодинамске параметре, биохемијске параметре и биомаркере оксидационог стреса и антиоксидационе заштите. Имајући у виду преваленцију малигнух обољења, фреквентност коришћења цисплатине и потенцијалне нежељене ефекте, при чему је кардиотоксичност један од најтежих и најзначајнијих, испитивање и поређење кардиотоксичности цисплатине и новосинтетисаних комплекса Ru(II) који испољавају антитуморски потенцијал, доприноси потпунијем сагледавању ефеката који комплекси Ru(II) остварују у организму.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Слободан Новокмет, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

Проф. др Слободан Новокмет 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

Радови проф. др Слободана Новокмета који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Misić MM, Jakovljević VL, Bugarcic ZD, Zivkovic VI, Srejavic IM, Barudic NS, Djuric DM, **Novokmet SS**. Platinum Complexes-Induced Cardiotoxicity of Isolated, Perfused Rat Heart: Comparison of Pt(II) and Pt(IV) Analogues Versus Cisplatin. *Cardiovasc Toxicol*. 2015 Jul;15(3):261-8.
2. Perić T, Jakovljević VLj, Zivkovic V, Krkeljic J, Petrović ZD, Simijonović D, **Novokmet S**, Djuric DM, Janković SM. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. *Med Chem*. 2012 Jan;8(1):9-13.
3. **Novokmet S**, Jakovljević VLj, Jankovic S, Davidovic G, Andjelkovic N, Milanovic Z, Djuric DM. Human platelets perfusion through isolated guinea-pig heart: the effects on coronary flow and oxidative stress markers. *Gen Physiol Biophys*. 2009;28 Spec No:98-104.
4. **Novokmet S**, Heinemann FW, Zahl A, Alsfasser R. Aromatic interactions in unusual backbone nitrogen-coordinated zinc peptide complexes: a crystallographic and spectroscopic study. *Inorg Chem*. 2005 Jun 27;44(13):4796-805.
5. **Novokmet S**, Alam MS, Dremov V, Heinemann FW, Müller P, Alsfasser R. The deposition of metalloprotein-based coordination polymers on graphite substrates: effects of side-chain functional groups and local surface structure. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005 Jan 21;44(5):803-6.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална фармакологија

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;
3. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;

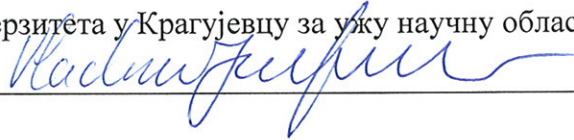
ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, *mr ph* Катарина Радоњић, 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.

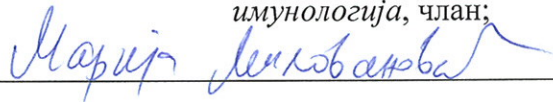
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата *mr ph* Катарине Радоњић, под називом “Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине и $Ru(II)$ комплекса на изоловано срце и оксидациони стрес пацова“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

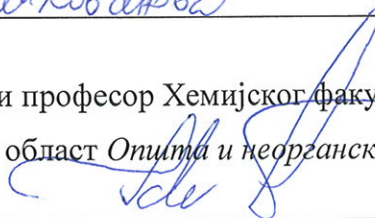
1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;



2. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;



3. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;



У Крагујевцу, 09.07.2017. године