

## 1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-39132/3-1, од 24. 04. 2013. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Мр Мирослава Мишића, под називом:

### „Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни 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 Хемија,
2. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Слободан Новокмет**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

## 2. Извештај комисије о подобности теме

### 2.1. Кратка биографија кандидата

Мр Мирослав Мишић је рођен 03.06.1975. године у Пожаревцу. Основну школу је завршио у Голупцу, а Гимназију у Великом Градишту. Од 1994. до 1995. године био је на редовном одслужењу војног рока.

Након одслужења војног рока уписао је Вишу медицинску школу у Београду –Земуну, на којој је дипломирао 01.06.1998. године. Септембра 1998. године уписао је Дефектолошки факултет у Београду. Студије је прекидао због учешћа у рату 1999. године. Крајем 1999. године почео је да ради на Универзитетској Дечјој клиници у Београду. Дефектолошки факултет је завршио 21.03.2003. године.

Од почетка школске 2004/05. године ради као сарадник на Високој здравственој школи струковних студија у Београду-Земуну, на смеру Виших радиолошких техничара.

Године 2005. уписао је студије за стицање академског назива Магистар наука на Дефектолошком факултету у Београду. Од 2009. године ради на Високој здравственој школи струковних студија у Београду – Земуну, смер за Струковне медицинске радиологе. Магистрирао је 07. 04. 2011. године на тему „Злостављање деце и здравствени радници“.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** „Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова“

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

**Хипотеза:** Основна хипотеза студије је да акутна апликација Pt(IV)-комплекса, калијум-тетрахлоро-платината (II), цисплатине, 1,2-диамино-циклохексана и етилен-диамина може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

## 2.3. Подобност кандидата

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:

**Мишић М, Петровић Н.** Перцепција здравствених радника која се односи на број и карактеристике деце жртава злостављања и злостављача. Здравствена заштита 2012; 46(4): 71-6 **M53=1 бод**

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Прво комплексно једињење платине које се више од три деценије користи у медицини као антитуморски агенс (цитостатик) је цисплатина, *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. Механизам антитуморског дејства цисплатине огледа се у интеракцији са молекулом ДНК. Цисплатина се користи за лечење карцинома тестиса, оваријума, мокраћне бешике, плућа као и лечење карцинома који су резистенти према другим цитостатикима. Поред доказане клиничке успешности (стопа излечења преко 90 одсто у случају карцинома тестиса) хемиотерапија цисплатином је ограничена недостацима: појава резистенције, тешка нежељена дејства и токсичност (неуротоксичност, ототоксичност, нефротоксичност, кардиотоксичност). У циљу превазилажења недостатака, извршене су промене у структури цисплатине, што је резултовало појавом карбоплатине, оксалилплатине и недаплатине. Комплекси платине са 1,2-диаминоциклохексаном (1,2-*dach* или *dach*) као лигандом показали су антитуморску активност према оним ћелијама тумора које су резистенте у односу на цисплатину као и смањену нефротоксичност и мијелотоксичност. Превођење двовалентних, Pt(II)-комплекса платине у одговарајуће четворовалентне Pt(IV)-комплексе платине, вршено је ради добијања кинетички инертних аналога са већом биорасположивошћу. Антитуморска активност Pt(IV) комплекса се огледа у биотрансформацији (редукцији) до активног Pt(II) облика, *in vivo*, који даље испољава цитотоксичне ефекте аналогне цисплатини или њеним дериватима, због чега се овакви комплекси називају прекурсори двовалентних аналога. Тетраплатина (ормаплатина), [PtCl<sub>4</sub>(*dach*)], је Pt(IV) комплекс који поседује антитуморску активност, смањену нефротоксичност и мијелотоксичност у односу на цисплатину и карбоплатину али не и неуротоксичност, док нема података о кардиотоксичности. Познато је да неки Pt(IV) комплекси поседују повећану липофилност, што омогућава њихову потенцијалну оралну примену. 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.

## 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 резултовало 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. Превођење двовалентних, Pt(II)-комплекса платине у одговарајуће четворовалентне Pt(IV)-комплексе платине, вршено је ради добијања кинетички инертних аналога са већом биорасположивошћу.

С друге стране, улога оксидационог стреса у патогенези преко двеста акутних и хроничних болести (међу њима и многих кардиоваскулраних 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(IV)-комплекса, калијум-тетрахлоро-платината (II), цисплатине, 1,2-диамино-циклохексана и етилен-диамина на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Цисплатина, као референтни цитостатик из групе деривата платине се користи за лечење карцинома тестиса, оваријума, мокраћне бешике, плућа као и лечење карцинома који су резистенти према другим цитостатикима. Поред доказане клиничке успешности (стопа излечења преко 90 одсто у случају карцинома тестиса) хемиотерапија цисплатином је ограничена недостацима: појава резистенције, тешка нежељена дејства и токсичност (неуротоксичност, ототоксичност, нефротоксичност, кардиотоксичност). У циљу превазилажења недостатака извршене су промене у структури цисплатине, што је резултовало појавом карбоплатине, оксалилплатине и недаплатине. Комплекси платине са 1,2-диаминоциклохексаном (1,2-*dach* или *dach*) као лигандом показали су антитуморску активности према оним ћелијама тумора које су резистентне у односу на цисплатину као и смањену нефротоксичност и мијелотоксичност. Превођење двовалентних, Pt(II)-комплекса платине у одговарајуће четворовалентне Pt(IV)-комплексе платине, вршено је ради добијања кинетички инертних аналога са већом биорасположивошћу. Антитуморска активност Pt(IV) комплекса се огледа у биотрансформацији (редукцији) до активног Pt(II) облика, *in vivo*, који даље испољава цитотоксичне ефекте аналогне цисплатини или њеним дериватима, због чега се овакви комплекси називају прекурсори двовалентних аналога. Тетраплатина (ормаплатина), [PtCl<sub>4</sub>(dach)], је Pt(IV) комплекс који поседује антитуморску активност, смањену нефротоксичност и мијелотоксичност у односу на цисплатину и

карбоплатину али не и неуротоксичност, док нема података о кардиотоксичности. Познато је да неки Pt(IV) комплекси поседују повећану липофилност, што омогућава њихову потенцијалну оралну примену. 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.

## 2.7. Методе истраживања

### *Врста студије*

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

### *Популација која се истражује*

Планирано истраживање би обухватило 84 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе  $250 \pm 50$ 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*

Истраживање ће бити подељено у седам (7) експерименталних група (12 животиња у групи): 1) контролна група (перфузија комплексним *Krebs-Hensenleit*-овим физиолошким раствором), 2) апликација етилендиамин-Pt(IV) комплекса ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  mol/l), 3) апликација 1,2-диамино-циклохексан-Pt(IV) комплекса ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  mol/l), 4) апликација калијум-тетрахлороплатината(II) ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  mol/l), 5) апликација цисплатине ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  mol/l), 6) апликација 1,2-диамино-циклохексана ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  mol/l), 7) апликација етилендиамин ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  mol/l). В

Вредност коронарног протока би се одређивала флоуметријски. 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)  $dp/dt \text{ max}$  - максимална стопа промене притиска у левој комори, б)  $dp/dt \text{ min}$  - минимална стопа промене притиска у левој комори, в) SLVP - систолни притисак леве коморе, г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе, ђ) HR - срчана фреквенца и е) MBP - средњи перфузиони притисак.

Испитиване супстанце ће се апликовати континуираном перфузијом (минимално 5 мин) док се не постигне стабилни коронарни проток. У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид ањон радикал ( $\text{O}_2^-$ ), водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и параметри ензимске некрозе миокарда: аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT), лактат дехидрогеназа (LDH), креатин киназа (СК), изоензим МБ (СК-МБ). Сви параметри ензимске некрозе миокарда одређиваће се у Центру

за лабораторијску дијагностику, Клинички центар Крагујевац, Република Србија, из узорак коронарних венских ефлуената, сакупљаних на већ описани начин, на апарату *Olympus AU 400 (Olympus, Japan)*.

Статистичка обрада експерименталних података ће се вршити на следећи начин: 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 т-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. Статистичка обрада података ће се радити у статистичком пакету *SPSS 10.0 for Windows*.

## 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Pt(IV)-комплекси су кинетички инертни, липофилни и поседују антитуморску активност. У односу на цисплатину су мање нефротоксични и мијелотоксични, док подаци о кардиотоксичности скоро и да не постоје.

С обзиром на то да не очекујемо већу кардиотоксичност испитиваних Pt(IV)-комплекса на изолованом срцу пацова у односу на цисплатину, значај студије би био допринос разумевању механизма кардиотоксичности Pt(IV)-комплекса као и даљим истраживањима у правцу њиховог коришћења у хемотерапији.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Недостаци цисплатине (нежељена дејства, појава резистентности и висока токсичност) навели су истраживања у правцу синтезе једињења платине са истом или већом ефикасношћу и смањеном токсичношћу. Кинетичка инертност четворовалентних комплекса платине - Pt(IV) комплекса, повећава могућност да стигну неизмењени до ћелије, док неки Pt(IV) комплекси имају повећану липофилност што омогућава потенцијалну оралну примену. У студији ће се упоређивати кардиотоксичност два Pt(IV) комплекса у односу на цисплатину, полазну со за синтезу комплекса [калијум-тетрахлоро-платинат(II)] и лиганде: етилен-диамин (*en*); 1,2-диамино-циклохексан (*dach*) на моделу изолованог перфундованог срца пацова. Перфузија раствора наведених супстанци обавиће се у распону концентрација од  $10^{-4}$  M до  $10^{-8}$  M. Испитивање кардиотоксичности огледаће се у мерењу контрактилности, коронарног протока и параметара оксидативног стреса изолованог срца пацова.

Главна хипотеза овог истраживања је да се не очекује већа кардиотоксичност испитиваних Pt(IV)-комплекса на изолованом срцу пацова у односу на цисплатину, док би њен највећи значај био допринос дањим истраживањима у правцу коришћења Pt(IV)-комплекса у хемиотерапији.

## **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.

## **2.12. Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Живадин Бугарчић**, председник, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хемија,
2. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Слободан Новокмет**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

## Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Мр Мирослава Мишића, 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 Мр Мирослава Мишића 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 Мр Мирослава Мишића под називом „Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова“ и одобри њену израду.

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

---

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

---

**Проф. др Слободан Новокмет**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија

---

У Крагујевцу, 04. 06. 2013.