

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО 24.05.17			
Ср. јед.	Број	Прилог	Вредност
05	6598/3-3		

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

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-456/27 од 03.05.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Јелене Шмигић** под називом:

**“Утицај хроничне примене цисплатине и диетил-естра лиганда (L3) (S,S)-етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил) дипропионат дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију 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 Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;

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

**ИЗВЕШТАЈ**

Кандидат **мр фарм Јелена Шмигић** 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

Мр фарм Јелена Шмигић је рођена у Подгорици 1986. године. Основну школу и гимназију, природно математички смер је завршила у Подгорици. Фармацеутски факултет је завршила у Београду 2011. године. Радила је као сарадник у настави на модулу козметологија на Фармацеутском факултету у Подгорици од септембра 2011. године до фебруара 2012. године. Од јуна 2012. године до децембра 2015. године радила је у Агенцији за лекове и медицинска средства Србије. Уписала је докторске студије у октобру 2011. године на Фармацеутском факултету у Београду на модулу Фармацеутска технологија, а у новембру 2015. године се уписала на другу годину докторских академских студија на модулу Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** “Утицај хроничне примене цисплатине и диетил-естра лиганда (L3) (S,S)–етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил) дипропионат дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова“

**Предмет:** Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине (CDDP) и диетил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат-дихидрохлорида ((S,S)-Et<sub>2</sub>-eddch) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

**Хипотезе:** У поређењу са цисплатином, хронична примена етил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) има мање штетно дејство на функцију срчаног мишића и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

Поред тога очекује се и:

- а) мање ослобађање маркера оксидационог стреса
- б) постојање мањих хистолошких промена срчаног мишића, јетре и бубрега
- в) блаже одступање у вредностима липидограма, урее, креатинина и протеина

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

Кандидат, мр фарм Јелена Шмигић, је објавила рад у целини у часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

**Smigic J, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic T, Jeremic J, Sabo T, Jakovljevic V.** The effects of chronic administration of cisplatin on oxidative stress in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2017; DOI: 10.1515/sjestr-2017-0003 **M52**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Цисплатина и њени деривати имају водећу улогу у терапији карцинома. Цисплатина се користи за лечење карцинома тестиса, оваријума, мокраћне бешике, плућа, као и лечење карцинома који су резистентни на друге цитостатике.

Цитотоксични ефекат цисплатине се огледа у њеној интеракцији са молекулом ДНК, РНК и протеинима, индуковању оксидационог стреса, што доводи до програмиране ћелијске смрти. И поред доказане успешности у лечењу карцинома, главни проблем употребе цисплатине у терапији су појава резистенције, тешка нежељена дејства и токсичност (нефротоксичност, ототоксичност, периферна неуропатија, неутропенија, тромбоцитопенија, ембриотоксичност, мутагеност и кардиотоксичност).

Лимитирајући фактори употребе цисплатине (резистенција и токсичност) навели су истраживаче на трагање за новим неплатинским хемотерапеутским агенсима. Проблем цитотоксичних агенаса који се данас користе у терапији је недовољна селективност, јер су туморске ћелије мутиране форме нормалних ћелија које се неконтролисано размножавају.

Естерификовани циклохексил аналози етилендиамин дипропаноинске киселине изазивају дозно-зависну апоптозу ћелија леукемије, тако што индукују продукцију супероксид анјон радикала, деполаризацију мембране митохондрија, индукују транслокацију фактора индукције апоптозе (AIF) из једра и фрагментацију ДНК. Ови агенси су изразили значајну селективност ка ћелијама леукемије, у поређењу са нормалним једноједарним крвним ћелијама, што је повезано са гранулоцитном диференцијацијом ћелија леукемије.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду тренд оболевања од малигних болести и могуће компликације лечења ових обољења према прихваћеним протоколима уз употребу одговарајућих хемиотерапеутика, развој нових антитуморских лекова са потенцијално нижим токсичним потенцијалом за здраве ћелије и већом селективношћу за туморске ћелије је од великог значаја.

Циљеви истраживања подразумевају:

1. Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине (CDDP) и диетил-естра лиганда (*S,S*) етилендиамин-*N,N*-ди-2-(3-циклохексил) дипропаноат-дихидрохлорида ((*S,S*)-Et2-eddch) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на кардиодинамске параметре и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Испитивање улоге различитих параметара оксидационог стреса: азот монооксида (NO мереног у облику нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)), супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у насталим променама кардиодинамских параметара срчаног рада и коронарне циркулације.
3. Испитивање хистолошких промена насталих услед хроничне примене цисплатине (CDDP) и диетил-естра лиганда (*S,S*) етилендиамин-*N,N*-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат-дихидрохлорида ((*S,S*)-Et2-eddch) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчаном мишићу, јетри и бубрезима.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

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

Компелкси платине са различитим лигандима су показали антиканцерогену активност. На основу структурне аналогије платине(II), злата(II) и паладијума(II), најинтересантнији су деривати паладијума (Pd(II)) као потенцијални антитуморски агенси.

Антитуморска активност металофармацеутика зависи од лиганда, односно његове способности да модификује реактивност и липофилност лека. У највећем броју случајева антитуморска активност је постигнута захваљујући координацији лиганда са металним јоном, али у неким случајевима лиганд-прекурсор, као што је функцијализовани циклохексил дихидрохлорид, показује изразиту активност.

Показано је да примена цисплатине изазива повећање нивоа укупних липида, холестерола, урее и креатинина у плазми животиња, као и релативне масе бубрега, док са друге стране, изазива смањење укупних протеина и албумина, и телесне масе.

Подаци добијени увидом у цитотоксичност нових циклохексил-једињења, могу допринети даљем истраживању ових једњења, њихових нових биолошких ефеката, самостално или као део металофармацеутика.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

Планирано истраживање би обухватило пацове (*Wistar albino* сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе  $250 \pm 50$  g), којима би се изоловало срце и перфундовало методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-овом моделу (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) уз промену перфузионог притиска од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>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 предат Етичком одбору за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

### **2.7.3. Узорковање**

Животиње ће бити подељене у шест (6) експерименталних група, у свакој по 12 животиња.

Четири експерименталне групе ће четири недеље примати појединачну дозу испитиваног једињења (4 mg/kg телесне масе) интраперитонеално (i.p.) једном недељно, док су остале две групе контролне и четири недеље ће и.п. примати једном недељно физиолошки раствор (прва група) и диметил сулфоксид (*DMSO*) (друга група). Концентрација раствора примењених једињења је 1 mg/ml.

1. Група: i.p. физиолошки раствор (4 ml/kg телесне масе)
2. Група: i.p. диметил сулфоксид (*DMSO*) (4 ml/kg телесне масе)
3. Група: i.p. цисплатина у физиолошком раствору (4 mg/kg телесне масе)
4. Група: i.p. L3 – *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлорид у *DMSO* (4 mg/kg телесне масе)
5. Група: i.p. Октахедрални Pt(IV) комплекс са *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлорид (L3) [PtCl<sub>4</sub>{(*S,S*)-Et<sub>2</sub>eddch}] у *DMSO* (4 mg/kg телесне масе)
6. Група: i.p. Pd(II) комплекси са *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлорид [PdCl<sub>2</sub>{(*S,S*)-Et<sub>2</sub>eddch}] у *DMSO* (4 mg/kg телесне масе)

Укупан број експерименталних животиња је 72 (по 12 у свакој групи).

#### 2.7.4. Варијабле

Након завршеног експерименталног протокола животиње ће се жртвовати, изоловаће се срце и перфундоваће се 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 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 и
- ђ) *HR* - срчана фреквенца.

Функција миокарда ће се испитивати при различитим перфузионим притисцима од 40 до 120 cm H<sub>2</sub>O.

Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала флоуметријски.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, током перфузије спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS
2. азот моноксид у облику нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)
3. супероксид анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
4. водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Током жртвовања животињама ће се узимати крв и из плазме ће се одређивати:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS
2. азот моноксид у облику нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)
3. супероксид анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
4. водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

као и биохемијски маркери:

1. укупни липиди и холестерол
2. укупни протеини и албумини
3. уреаа и креатинин

Из еритроцита ће се одређивати ензими антиоксидационе заштите:

1. супероксид дизмутаза (SOD)
2. каталаза (CAT)
3. глутатион пероксидаза (GPH)

Хистолошком анализом срца би се утврдиле промене настале на нивоу срчаног мишића, јетре и бубрега.

Током трајања експеримента у одговарајућим интервалима, животињама ће се мерити 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 рачунарског програма (24). Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 72 (по 12 у свакој групи).

### 2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*:

1. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користе се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
2. За испитивање нормалности расподеле користе 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, користе 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, користе се *Bonferroni* тест.

### 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да у поређењу са цисплатином, хронична примена етил-естра лиганда (*S,S*)етилендиамин-*N,N*-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) има мање штетно дејство на функцију срца и реактивност коронарног ендотела изолованог срца пацова као и да индукује мању промену маркера оксидационог стреса. Значај нашег истраживања би се огледао кроз допринос у разумевању ефеката новог лиганда и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на функцију и перфузију срца односно компарације са дејствима цисплатине на срчано ткиво. Процена штетних кардиоваскуларних ефеката металофармацеутика допринеће синтези нових лиганда и њихових комплекса са металима, као потенцијалних антитуморских агенаса.



## 2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Имајући у виду значај малгних болести у погледу броја оболелих, тежине и исхода болести, као и социјални аспект ових болести постоји велика потреба за развојем нових хемиотерапијских лекова који имају већу селективност за туморске ћелије и мање изражене токсичне ефекте на остала ткива. Резултати ове студије могу да помогну бољем разумевању и расветљавању до сада неразјашњених механизма деловања потенцијално нових хемиотерапијских агенаса, као и њихов токсични потенцијал на кардиоваскуларни систем. Такође, сазнања ове студије би могла да буду одлична основа за даља предклиничка испитивања и самим тим помогла у процени евентуалне клиничке употребе нових хемиотерапеутика.

## 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

Доц. др Владимир Живковић 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 доц. др Владимира Живковића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Stojanovic M, **Zivkovic V**, Srejovic I, Jakovljevic V, Jeremic N, Djuric D. The role of hydrogen sulfide in homocysteine-induced cardiodynamic effects and oxidative stress markers in the isolated rat heart. *Physiol Int.* 2016; 103(4):428-438.
2. Stojic I, Srejovic I, **Zivkovic V**, Jeremic N, Djuric M, Stevanovic A, Milanovic T, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *J Physiol Biochem.* 2017; 73(1):141-153.
3. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejovic I, **Zivkovic V**, Tatalović N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced

changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. Toxicol Lett. 2016; 242:34-46.

4. Misić MM, Jakovljević VL, Bugarcic ZD, **Zivković VI**, Srećković IM, Barudžić NS, Đurić 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; 15(3):261-8.
5. **Zivković V**, Jakovljević V, Pečanová O, Srećković I, Joksimović J, Selaković D, Barudžić N, Đurić DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. Biomed Res Int. 2013; 2013:318471.
6. Perić T, Jakovljević VLj, **Zivković V**, Krkeljić J, Petrović ZD, Simijonović D, Novokmet S, Đurić DM, Janković SM. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. Med Chem. 2012; 8(1):9-13.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална физиологија са спортском медицином

#### **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 Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, 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, мр фарм. Јелена Шмигић, 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.

Узимајући у обзир сугестије Комисије за научно-истраживачки рад да обратимо пажњу на наслов, Комисија сматрамо да њега треба преформулисати и предлажемо Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата мр фарм. Јелене Шмигић, под следећим називом “Утицај хроничне примене цисплатине и диетил-естра лиганда (S,S)–етилендиамин-N,N’-ди-2-(3-циклохексил) пропионат дихидрохлорида (L3) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова“ и одобри њену израду.

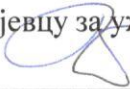
## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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



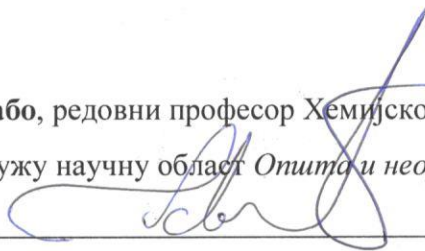
---

2. Проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан



---

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



---

У Крагујевцу, 09. 05. 2017. године