

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРЕДМЕТ:
ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, одржаној дана 24. 12. 2014. године, одлуком бр. 01-14219/3-19 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом "Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова" кандидата Мр Мирослава Мишића, у следећем саставу:

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 редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија
3. Проф. др Драган Ђурић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Мр Мирослава Мишића и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Мр Мирослава Мишића у наслову "Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца

пацова" представља једну од првих студија у свету која се бавила новим приступом у испитивању утицаја новосинтетисаних Pt(IV)-комплекса на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката.

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 цитостатицима. 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 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), [PtCl₄(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.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података "Medline" и "Cochrane database of systematic reviews" помоћу следећих кључних речи: " Pt(IV) complexes", "oxidative stress", "coronary circulation", "isolated

rat heart” утврђено је да до сада није спроведена студија у којој је процењиван значај улоге комплекса платине, а поготову не Pt(IV)-комплекса на срчани мишић и коронарну циркулацију, као и могуће механизме добијених ефеката, посебно са аспекта улоге оксидационог стреса по форми и садржини идентична овој студији. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата "Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова", представља резултат оригиналног научног рада на пољу истраживања у области физиологије кардиоваскуларног система.

2.3.Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Мр Мирослав Мишић, предавач за област медицина, ужа научна област Радиологија Високе здравствене школе струковних студија у Београду – Земуну, смер за Струковне медицинске радиологе, аутор је или коаутор више научних радова из области биомедицинских наука.

Прва студија је имала за циљ да дође до сазнања о перцепцији здравствених радника која се односила на број и карактеристике деце жртава злостављања и злостављача, као и о феноменологији злостављања деце у нашој земљи. На основу запажања здравствених радника формиран је профил детета жртве злостављања, добијени су подаци о облику злостављања ком је дете било изложено, као и о старости и полу детета жртве. Утврђено је да су деца старости између једне и пет година и жртве су физичког злостављања. Такође је закључено да су најчешћи злостављачи деце чланови њихових породица. Ова студија је објављена у часопису категорије **M53** (Здравствена заштита 2012; 4:71-76).

Друго истраживање се бавило проучавањем степена изражености синдрома "сагоревања" на раду (burnout syndrome) код запослених (предавача, медицинског особља, социјалних радника) у школама за децу ометену у развоју Републике Србије, као и повезаности између демографских карактеристика запослених и нивоа захваћености овим синдромом. Резултати су показали да највећи проценат запослених пати од емоционалне исцрпљености, док је у високом степену заступљена и смањена радна ефикасност. Ово истраживање је објављено у часопису категорије **M23** (Health MED Journal 2012; 6 (10):3403-3412).

Циљ треће студије је био да прикупи податке о спремности здравствених радника да пријаве злостављање деце у Републици Србији, као и да евалуира оспособљеност и стручност здравствених радника наше земље за обављање процедура овог типа. Добијени подаци указују да је само петина здравствених радника који су пријавили случајеве

злостављања деце, препознало симптоме злостављања. С друге стране, од укупног броја здравствених радника који су пријавили злостављање деце, већина њих је прошла регуларну обуку за обављање овог посла. Ова студија је објављена у часопису Health MED Journal 2013; 7 (4):1300-1306.

Следеће истраживање је имало за циљ да испита ставове здравствених радника према злостављању деце и према заштити од злостављане деце. Закључено је да се ставови здравствених радника према физичком кажњавању деце и према заштити злостављане деце разликују и не иду увек у прилог злостављаној деци. Ово истраживање је објављено у часопису категорије **M53** (Здравствена заштита 2014; 1:23-31).

Задатак пете студије је био да сумира рад радиолошког одсека при Високој здравственој школи струковних студија у Београду у претходне четири деценије. Студија доноси важне информације о вишедецинијском путу образовања кадра у области радиолошке технике у Србији, са посебним освртом на рад Високе здравствене школе струковних студија у Београду. Ова студија је објављена у часопису категорије **M53** (Здравствена заштита 2014; 5:71-75).

Наредно истраживање је имало за циљ да испита и упореди кардиотоксичност пет комплекса платине различитих концентрација на моделу изолованог срца пацова. Резултати истраживања су показали да је најизраженији дозно зависни ефекат остварила цисплатина. Налази ове студије би могли бити значајни за боље разумевање штетних дозно зависних ефеката нових антитуморских лекова што би могло да има и клиничку импликацију у смислу рационалније употребе ових агенаса. Ово истраживање је објављено у часопису категорије **M23** (Cardiovasc Toxicol. 2014; Nov: 767-774).

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

- **Мишић М**, Петровић Н. Перцепција здравствених радника која се односи на број и карактеристике деце жртава злостављања и злостављаче. Здравствена заштита 2012; 4:71-76. **M53 – 1 бод**
- Petkovic N, Petrovic Macesic D, Balos V, **Misic M**, Djordjevic M. Burnout syndrome among special education professionals. Health MED Journal 2012; 6 (10):3403-3412. **M23 – 3 бода**
- **Misic M**, Eminovic F, Milenovic L, Mirkovic S. Detecting and reporting child abuse by health workers in Serbia. Health MED Journal 2013; 7 (4):1300-1306. **часопис није категорисан за 2013. годину**

- **Мишић М**, Китановић К, Петровић Н. Ставови здравствених радника према злостављању деце и према заштити злостављане деце. Здравствена заштита 2014; 1:23-31. **M53 – 1 бод**
- **Мишић М**, Китановић К. Четири деценије рада Радиолошког одсека при Високој здравственој школи струковних студија у Београду. Здравствена заштита 2014; 5:71-75. **M53 – 1 бод**
- **Miroslav M. Misic**, Vladimir L. Jakovljevic, Zivadin D. Bugarcic, Vladimir I. Zivkovic, Ivan M. Srejovic, Nevena S. Barudzic, Dragan M. Djuric, Slobodan S. Novokmet. Platinum Complexes-Induced Cardiotoxicity of Isolated, Perfused Rat Heart: Comparison of Pt(II) and Pt(IV) Analogues Versus Cisplatin. *Cardiovasc Toxicol* 2014; Nov: 767-774. DOI 10.1007/s12012-014-9293-8. **M23 – 3 бода**

2.4.Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Циљеви истраживања идентични су са одобреним у пријави тезе.

Докторска дисертација Мр Мирослава Мишића, написана је на 94 странице и садржи следећа поглавља: Увод, Циљеве истраживања, Методе рада, Резултате, Дискусију, Закључке и Литературу. Рад садржи 14 табела, 8 схема, 1 слику и 9 графикана, док је у поглављу "Литература" цитирано 175 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

У студији је анализирано 84 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 г) којима је срце изоловано и перфундовало методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O. Све експерименталне процедуре су рађене 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.

Истраживање је било 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).

Вредност коронарног протока је одређивана флоуметријски. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућено је 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, ђ) HR - срчана фреквенца и е) MBP - средњи перфузиони притисак.

Испитиване супстанце су апликоване континуираном перфузијом (минимално 5 мин) док се не постигне стабилни коронарни проток. У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријским методама су одређивани следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2).

Статистичка обрада експерименталних података је вршена на следећи начин: За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћене су: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења, за испитивање нормалности расподеле коришћени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*, за тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, коришћени су 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, коришћен је *Bonferroni* тест. Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 10.0 for Windows*.

У уводном делу кандидат је веома опсежно, јасно и прецизно, користећи најсавременије литературне податке изложио савремена сазнања о испитивању улоге до сада синтетисаних деривата платине у терапији (поготову малигних обољења), као и потенцијалним кардиотоксичним ефектима истих, посебно са аспекта потенцијалне улоге оксидационог стреса у механизму њиховог дејства.

У другом поглављу јасно су изложени циљеви истраживања као и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљевима: евалуација ефеката 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. Поред ових основних, постављени су и специфични

циљеви: испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2)) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.

Материјал и методологија рада, подударни са наведеним у пријави дисертације, презентовани су на одговарајући начин и врло прецизно. Студијски узорак је чинило 84 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 г) којима је срце изоловано и перфундовало методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O. Све експерименталне процедуре су рађене 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.

Истраживање је било 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).

Вредност коронарног протока је одређивана флоуметријски. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућено је 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, ђ) HR - срчана фреквенца и е) MBP - средњи перфузиони притисак.

Испитиване супстанце су апликоване континуираном перфузијом (минимално 5 мин) док се не постигне стабилни коронарни проток. У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријским методама су одређивани следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2).

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани са 14 табела и 9 графикана. Показано је: да су директни ефекти Pt(IV)-комплекса ($[\text{PtCl}_4(\text{en})]$) и

[PtCl₄(dach)]) и етилендиамин на изоловано срце пацова били доминантно ограничени на коронарни ендотел, а мање на срчани мишић; да је перфундовање срца калијум-тетрахлороплатинатом(II) је поред вазоконстрикторног ефекта (дозно-зависан пад коронарног протока) показало прооксидативно дејство (повећање вредности нитрита и индекса липидне пероксидације); да је цисплатина индуковала депресију функције изолованог срца пацова што се манифестовало дозно-зависним снижењем вредности контрактилности, коронарног протока и смањењем фреквенце срца, као и да перфундовање срца са 1,2-диамино-циклохексаном није изазвало значајне ефекте на срчани мишић у овом експерименталном моделу.

У поглављу дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. У последњем пасусу поглавља кандидат износи предлоге у смислу даљих истраживања у овој области.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација у наслову "Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова", по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. На основу дозно-зависног снижења коронарног протока, закључено је да су директни ефекти Pt(IV)-комплекса ([PtCl₄(en)] и [PtCl₄(dach)]) и етилендиамин на изоловано срце пацова били доминантно ограничени на коронарни ендотел, а мање на срчани мишић.
2. Перфундовање срца калијум-тетрахлороплатинатом(II) је поред вазоконстрикторног ефекта (дозно-зависан пад коронарног протока) показало прооксидативно дејство (повећање вредности нитрита и индекса липидне пероксидације).
3. Цисплатина је индуковала депресију функције изолованог срца пацова што се манифестовало дозно-зависним снижењем вредности контрактилности, коронарног протока и смањењем фреквенце срца.
4. Перфундовање срца са 1,2-диамино-циклохексаном није изазвало значајне ефекте на срчани мишић у нашем експерименталном моделу.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати ове студије недвосмислено указују да су дејства да су директни ефекти новосинтетисаних деривата платине на изоловано срце пацова били доминантно ограничени на коронарни ендотел, а мање на срчани мишић, као и да нису индуковали поремећај редокс равнотеже, што није био случај са неким љиховим прекурсорима

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Интегрална верзија овог истраживања је публикована у водећем међународном часопису, а на основу овог истраживања је планиран низ истраживања у области испитивања утицаја нових активних супстанци на кардиоваскуларни систем.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Мр Мирослава Мишића под насловом "Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова" на основу свега наведеног, сматра да је истраживање у оквиру тезе засновано на савременим сазнањима и прецизно замишљеној методологији, и да је адекватно и прецизно спроведено. Добијени резултати су прегледни, јасни, добро продискутовани и дају значајан допринос у решавању актуелне и недовољно проучаване и третиране проблематике.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата Мр Мирослава Мишића, урађена под менторством Проф. др Слободана Новокмета, представља оригинални научни допринос и од великог је научног и практичног значаја за изучавање утицаја нових активних супстанци на кардиоваскуларни систем.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом "Ефекти Pt(IV) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидативни стрес изолованог срца пацова" кандидата Мр Мирослава Мишића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ 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 редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

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

Крагујевац, 12. 01. 2015.