

**НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Предмет: Подобност теме и кандидата Иване Т. Костић, дипл. фарм. за израду докторске дисертације

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду бр. 35/175 од 26.06.2014. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Иване (Томислав) Костић, дипл. фарм. за израду докторске дисертације и научне заснованости теме:**

**Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као
системи за продужено ослобађање активних супстанци**

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1.1. Биографски подаци

Кандидат **Ивана (Томислав) Костић**, дипломирани фармацеут, рођена је 13. децембра 1984. године у Београду. Основну школу „Зага Маливук“ у Београду завршила је као ђак генерације, а Прву београдску гимназију 2003. године као носилац Вукове дипломе. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2003/2004. године, а дипломирала је 7. јула 2009. године са просечном оценом 9,29. Дипломски рад „Утицај хидродинамичких услова на брзину растварања фелодипина из таблета са продуженим ослобађањем“ урадила је и одбранила са оценом 10 на Институту за фармацеутску технологију и козметологију на Фармацеутском факултету, Универзитета у Београду.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је школске 2009/2010. године под менторством др Бранка Бугарског, редовног професора. Све испите предвиђене планом и програмом докторских студија положила је са просечном оценом 10 укључујући и завршни испит (приступни испит за израду докторске дисертације) под називом: "Морфолошка и биохемијска карактеризација мембрана еритроцита добијених контролисаном хемолизом од отпадне кланичне крви: потенцијални носачи за инкапсулацију биолошки активних супстанци".

Предмет	ЕСПБ	Оцена
1. Одабрана поглавља биохемије-витамини	5	10
2. Хемијска кинетика	5	10
3. Инжењерство ћелије	5	10
4. Феномени преноса у биолошким системима	5	10
5. Санитарна микробиологија	4	10
6. Биоактивне материје у козметици	4	10
7. Одабрана поглавља инструменталне анализе	7	10
8. Имобилизаним биокатализатори: технике, биореактори и примена	6	10
9. Физичко-хемијске основе фармацеутског инжењерства	5	10
10. Одабрана поглавља математичке анализе	5	10
11. Завршни испит	30	10
Укупно	86	

Од фебруара 2010. до фебруара 2011. године била је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије у оквиру пројекта технолошког развоја бр. 18002. У звање истраживач приправник изабрана је 27. јануара 2011. године. Од 1. фебруара 2011. године запослена је као истраживач приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду на пројекту „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010) који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. У звање истраживач сарадник изабрана је 7. септембра 2012. године.

Од 2011. године била је учесник на три међународна научна пројекта (M104): "Development of enzyme processes for production of egg white protein hydrolysates" (E! 6750- ENZEGG), који се реализује у оквиру међународног ЕУРЕКА Програма у сарадњи организација из Републике Србије и Републике Словеније у периоду 2011-2014. године; "Stabilisation of natural bioactive compounds: Study of encapsulation techniques and release studies" који је реализован у оквиру билатералне сарадње између Републике Србије и Републике Португал у периоду 2011-2012. године; и "Hemoglobin from renewable source as a starting material for heme iron product for prevention and therapy of anemia in domestic animals: Optimization of process of isolation and purification of hemoglobin" који је реализован у оквиру билатералне сарадње између Републике Србије и Републике Словеније у периоду 2012-2013. године. Ивана Т. Костић је била и сарадник на једном иновационом пројекту Министарства просвете науке и технолошког развоја Републике Србије (M105) „Salviva® -хумана вештачка плувачка, технолошке могућности и клиничка примена“ (451-03-00605/2012-16/57) који је реализован у периоду од 2012. до 2013. године.

Током докторских студија Ивана Т. Костић похађала је курсеве сталног усавршавања, „School on Electron Microscopy“ који је у периоду од 19. до 20. априла 2011. организовао Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду, и „Fundamentals and Applications of Controlled Release and Drug Delivery“ који је 23. маја 2013. одржао Nicholas A. Peppas у организацији Универзитета у Београду. Учествовала је у организацији и представљању Иновационог центра Технолошко-металуршког

факултета на 57. Сајму технике и техничких достигнућа, одржаног у Београду од 13. до 17. маја 2013. Активан је члан Српског Друштва за микроскопију. Добитник је награде за најбољу постер презентацију рада "Scanning electron microscopy observation of erythrocyte ghosts isolated from slaughterhouse blood by gradual hemolysis" на међународној конференцији "Microscopy Conference" одржаној у Регенсбургу у Немачкој од 25. до 30. августа 2013. године.

Ивана Т. Костић је аутор или коаутор 12 радова штампаних у целини и то: шест (6) радова у међународним часописима (катеорија M20) од којих је два (2) рада публикувано у врхунским међународним часописима (M21), а четири (4) рада у међународним часописима (M23); пет (5) саопштења по позиву са међународних скупова штампаних у целини (M33) и једног (1) рада у научном часопису националног значаја (M53). Објавила је и 5 радова саопштених на домаћим и међународним скуповима, штампаних у изводу, од чега је једно (1) предавање по позиву са међународног скупа штампаног у изводу (M32), три (3) рада са међународних (M34), и један (1) рад са скупа националног значаја (M64). У оквиру истраживања током израде докторске тезе, Ивана Т. Костић руководила је експерименталним радом при изради завршног рада студента Ане Грујичић (бр. индекса 96/09) "Мембране говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви као потенцијални носачи за продужено ослобађање дексаметазон-натријум фосфата", Технолошко-металуршки факултет, Београд, јул 2014.

Објављени научни радови и саопштења:

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. **Kostić I.T.**, Ilić V.Lj., Đorđević V.B. Bukara K.M., Mojsilović S.B., Nedović V.A., Bugarski D.S., Veljović Đ.N., Mišić D.M., Bugarski B.M.: *Erythrocyte membranes from slaughterhouse blood as potential drug vehicles: Isolation by gradual hypotonic hemolysis and biochemical and morphological characterization*, - Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol 122, 2014 pp. 250-259. (IF = 4,287; Наука о материјалима, Биоматеријали, 7/32, 2013, ISSN 0927-7765)
2. Isailović BD, **Kostić IT**, Zvonar A, Đorđević VB, Gašperlin M, Nedović VA, Bugarski BM. *Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques*, - Innovative Food Science and Emerging Technologies Vol 19, 2013, pp. 181-189. (IF = 2,248; Прехрамбена технологија 33/122, 2013, ISSN 1466-8564)

Рад у међународном часопису (M23)

3. **Kostić I.T.**, Isailović B.D., Manojlović V.B., Lević S.M., Nedović V.A., Bugarski B.M.: *Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci*, - Hemijska Industrija Vol 66, No 4, 2012, pp. 505–517. (IF = 0,463; Хемијско инжењерство, 104/133, 2012, ISSN 0367-598X)
4. Pravilović R.N., Mojsilović S.B., **Kostić I.T.**, Ilić V.Lj., Bugarski D.S., Manojlović V.B., Bugarski B.M.: *Optimizacija procesa izolovanja hemoglobina iz goveđih eritrocita kontrolisanom hemolizom*, - Hemijska Industrija Vol 66, No 4, 2012, pp. 519–529. (IF = 0,463; Хемијско инжењерство, 104/133, 2012, ISSN 0367-598X)

5. Dimić I.D., Cvijović-Alagić I.Lj., **Kostić I.T.**, Perić-Grujić A.A., Rakin M.P., Putić S.S., Bugarski B.M.: *Metallic ion release from biocompatible cobalt-based alloy*, - Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 2013 doi:10.2298/CICEQ130813039D (IF = 0,656; Хемијско инжењерство, 103/133, 2013, ISSN 1451-9372)
6. **Kostić I.T.**, Ilić V.Lj., Bukara K.M., Mojsilović S.B., Đurić Z.Ž., Drašković P., Bugarski B.M.: *Flow cytometric determination of osmotic behaviour of animal erythrocytes toward their engineering for drug delivery*, - Hemijska Industrija 2014 doi:10.2298/HEMIND140124021K. (IF = 0,562 Хемијско инжењерство, 92/133, 2013, ISSN 0367-598X)

Предавање по позиву на међународном скупу штампано у изводу (M32)

7. Bugarski B., Nedović V., Pravilović R., **Kostić I.**, Bukara K., Ilić V.: *Optimization of the process of gradual hemolysis for isolation of haemoglobin from wasted blood obtained from slaughterhouse*, - Book of abstracts of COST Conference on Food Waste in the European Food Supply Chain: Challenges and Opportunities, 12-13 May 2014, Athens, Greece, pp. 16-17.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33)

8. **Kostić I.**, Stojanović R., Ilić V., Zarić M., Đorđević V., Bugarski B.: *Development of a heme iron feed supplement for prevention and therapy of anemia in domestic animals*, - Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, 23-26 May 2012, Novi Sad, Serbia, pp. 1639-1644.
9. Isailović B.D., **Kostić I.T.**, Zvonar A., Đorđević V.B., Gašperlin M., Nedović V.A., Bugarski B.M.: *Encapsulation of natural antioxidant resveratrol in liposomes*, - Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, 23-26 May 2012, Novi Sad, Serbia, pp. 1046-1051.
10. **Kostić I.T.**, Ilić V.Lj., Mojsilović S.B., Pravilović R.N., Bugarski B.M.: *Morfološka i biohemijska karakterizacija membrana eritrocita dobijenih iz otpadne klanične krvi*, - Proceeding of the 3rd International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry", 4-6 March 2013, Jahorina, Bosnia and Hercegovina, pp. 153-166.
11. Isailović B.D., **Kostić I.T.**, Đorđević V.B., Nedović V.A., Bugarski B.M.: *Prolipozomna metoda i metoda tankog filma za proizvodnju lipozoma sa inkorporiranim resveratrolom*, - Proceeding of the 3rd International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry", 4-6 March 2013, Jahorina, Bosnia and Hercegovina, pp. 247-253.
12. **Kostić I.**, Bukara K., Ilić V., Bugarski B.: *Effect of bovine blood storage in slaughterhouses on parameters relevant to hemoglobin isolation*, - Proceedings of the International 57th Meat Industry Conference "Meat and meat products—perspectives of sustainable production", 10-12 June 2013, Belgrade, Serbia, pp. 201-205.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

13. **Kostić I.**, Bukara K., Ilić V., Mojsilović S., Đorđević V., Isailović B., Veljović Đ., Bugarski B.: *Scanning electron microscopy observation of erythrocyte ghosts isolated from slaughterhouse blood by gradual hemolysis*, - Proceedings of the Microscopy Conference, 25-30 August, 2013, Regensburg, Germany, pp. 520-521.
14. Lević S., Obradović N., Pavlović V., Isailović B., **Kostić I.**, Bugarski B., Nedović V.: Thermal, morphological and mechanical properties of ethyl vanillin immobilized in polyvinyl alcohol by *electrospinning process*, - Book of abstracts of the 2nd Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry (CEEC-TAC2), 27-30 August 2013, Vilnius, Lithuania, PS2.40.
15. **Kostić I.**, Đorđević V., Ilić V., Bukara K., Nedović V., Bugarski B.: *Novel carriers of active substances derived from porcine slaughterhouse blood*, - Book of Extended Abstracts of the COST action FA 1001 WG1+WG2+WG3 meeting "The nano, micro, macro confluence in food structure for health, wellness and pleasure", 27-28 February 2014, Bucharest, Romania, pp. 36-37.

Рад у домаћем научном часопису (M53)

16. **Kostić I.T.**, Ilić V.Lj., Bugarski B.M.: Eritrociti kao savremeni nosači lekovitih supstanci: trenutni status, izazovi i izgledi za primenu u medicini,- *MD-Medical Data* Vol 4, No 3, 2012, pp. 287-292.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

17. Isailović B., **Kostić I.**, Trifković K., Stojanović R., Zarić M., Đorđević V., Bugarski B.: *Difuzija resveratrola iz lipidnih mikročestica dobijenih različitim tehnikama*, - Prvi kongres mladih hemičara Srbije, 19-20 Oktobar 2012, Beograd, Srbija, pp. 115-119.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током докторских студија и у оквиру научно-истраживачког рада на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, ИИИ46010 (2011-2014), **Ивана Т. Костић, дипл. фарм.**, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације припада области из које је кандидат аутор 2 (два) и коаутор 1 (једног) научног рада штампаних у међународним часописима и аутор или коаутор 6 (шест) саопштења на међународним и националним скуповима, што указује на то да је кандидат врло компетентан за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Примарни циљ фармацеутско-технолошког развоја јесте проналажење начина да се активна (лековита) супстанца преведе у формулацију која омогућава одговарајући терапијски одговор, контролисање места и брзине ослобађања лековите супстанце у

организму и смањење нежељених ефеката. За постизање овог циља потребно је развити системе за испоруку активних супстанци, тзв. „drug-delivery“ системе. Данас постоји изузетно велики број различитих система за испоруку лековитих супстанци који су развијени у складу са потребама потенцијалне апликације. Њихово константно усавршавање је последица све већег броја захтева које један систем за испоруку активних супстанци мора да испуни како би могао да има биомедицинску примену. Тренутно доступни системи за испоруку лековитих супстанци обухватају системе који представљају једноставне, растворљиве макромолекуле (као што су моноклонска антитела, растворљиви синтетски полимери, полисахариди и биодеградибилни полимери), али и много комплексније честичне вишекомпонентне структуре (микрокапсуле, микрочестице, липозоме, липопротеине, ћелије и ћелијске мембране). Системи за испоруку активних супстанци базирани на ћелијама и ћелијским мембранама ("духовима"), генерално, имају велику предност у односу на све до сада процесиране природне или синтетске носаче у смислу истовремене природне биокомпатибилности и функционализације. Ове карактеристике система за испоруку лековитих супстанци базираних на ћелијама дају им улогу вектора способних да несметано прођу кроз све биолошке мембране (анатомске, физиолошке, фагоцитне или инфламаторне). Поред тога, ови системи немају тенденцију ка агрегацији и променама морфолошких и површинских карактеристика у физиолошким условима, отпорни су на метаболичке процесе и могу слободно да пролазе кроз крвоток до тачно дефинисаног места у организму на коме лековита супстанца треба да испољи своје дејство. Другим речима, главна предност система заснованих на ћелијама је њихово биомиметско својство, односно карактеристика да имитирају унутрашњу средину организма (Pierigè и сар. 2008).

Када је реч о ћелијским носачима активних супстанци, највише истраживани и примењивани јесу еритроцити и еритроцитне мембране пореклом из хумане крви (Pierigè и сар. 2008). Показана је примена аутологих (сопствених) еритроцита као ефикасних система за испоруку и продужено ослобађање лековитих супстанци (Hamidi и Tajerzadeh 2003; Muzykantov 2010). Поред тога, савремене биотехнолошке методе за модификовање ћелијске мембране омогућавају да се у ове сврхе користе и имунолошки инкомпатибилни хумани еритроцити, а отвара се и могућност коришћења и ксеногених (животињских) еритроцита (Mansouri и сар. 2011). Међутим, до сада није развијена адекватна технологија која би омогућила коришћење животињских еритроцита у сврху носача активних компоненти. Наиме, таква технологија би била од великог значаја, нарочито имајући у виду да је расположива количина хуманих еритроцита (из крви која се због престарелости или неког недостатка не може користити за трансфузију крви) није велика. С друге стране, ксеногени еритроцити из отпадне кланичне крви су доступни у огромним количинама, те је развој технологије за њихову примену у системима за испоруку и продужено ослобађање лековитих супстанци економски оправдано.

Уопштено говорећи, данас се третирање споредних производа индустрија меса као отпада више не сматра ни еколошки добрим ни економски исплативим, посебно када се зна да овај „отпад“ заправо садржи значајне количине драгоценог сировог материјала који има велики потенцијал у стварању нових производа и функционалних састојака са додатном вредношћу (Toldra и сар. 2012). Отпадна кланична крв, као главни споредни производ индустрије меса је лако доступан извор биолошки важних агенаса (протеина, пептида, липида итд.) (Toldra и сар. 2012), али и мембрана еритроцита као потенцијалних носача активних супстанци. Истраживања су показала

да се као резултат процеса градуалне хемолизе говеђих еритроцита пореклом из кланичне крви добија хемоглобин као главни производ процеса, и мембране еритроцита, тзв. „духови“ као споредни производ истог (Стојановић и сар. 2012).

Циљ ове дисертације је развој процеса за изоловање говеђих и свињских еритроцитних мембрана („духова“) из отпадне кланичне крви, и развој система за продужено/контролисано ослобађање активних супстанци на бази добијених еритроцитних мембрана.

У сарадњи Института за медицинска истраживања и Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду развијен је поступак за изоловање ултрапречишћеног хемоглобина из престарелих хуманих еритроцита процесом градуалне хемолизе у оригинално дизајнираном мембранском реактору (Бугарски и Довезенски 2000). У процесу градуалне хемолизе, због постепеног смањења јонске јачине раствора (Dapin 1961), мембрана еритроцита савладава осмотски стрес, не долази до њеног пуцања, нити масовног ослобађања протеинских и липидних контаминаната. Описани поступак градуалне хемолизе поједностављује пречишћавање хемоглобина пореклом из престарелих хуманих еритроцита. У циљу пројектовања процеса који се може применити на еритроците пореклом из говеђе и свињске кланичне крви и којим би се очувала интактност изолованих мембрана, најпре ће се дефинисати специфичне осмотске карактеристике ових еритроцита. Затим ће се испитати морфолошке карактеристике и биохемијски састав изолованих мембрана с обзиром на то да су подаци о њима слабо доступни. У оквиру ове фазе рада испитивања ће обухватити:

- Одређивање основних хематолошких параметра говеђих и свињских еритроцита отпадне кланичне крви;
- Испитивање отпорности говеђих и свињских еритроцита на осмотску хемолизу и дефинисање степена осмотског бубрења говеђих и свињских еритроцита;
- Оптимизовање параметара процеса градуалне хемолизе за изоловање мембрана говеђих и свињских еритроцита: процес ће бити извођен са количинама стартног материјала које су најмање два реда величине веће од оних описаних у литератури и биће испитана динамика ослобађања хемоглобина и превођења еритроцита у "духове";
- Испитивање расподеле величине свињских и говеђих еритроцита и мембрана еритроцита (еритроцитних духова) добијених градуалном хемολизом;
- Испитивање утицаја процесних параметара на хемијски састав и структурно уређење добијених мембрана; Ова испитивања обухватају:
 - а) Утврђивање детаљних морфолошких карактеристика интактних говеђих и свињских еритроцита и еритроцитних духова добијених градуалном хемоллизом;
 - б) Испитивање протеинског састава мембрана говеђих и свињских еритроцита добијених градуалном хемоллизом;
 - в) Испитивање садржаја холестерола и реорганизације липидног двослоја мембрана говеђих и свињских еритроцита;
 - г) Испитивање антиоксидативног капацитета изолованих мембрана еритроцита.

Након дефинисања основних морфолошких и биохемијских карактеристика мембрана еритроцита добијених процесом градуалне хемоллизе, у следећој фази истраживања приступиће се испитивању могућности примене овог поступка за инкапсулацију модел супстанце, синтетског глукокортикоида и најшире коришћеног антиинфламаторног лека, дексаметазон-натријум фосфата (DexP). Дексаметазон је потентан, синтетски члан глукокортикоидне класе стероида са антиинфламаторним и имуносупресивним својствима. Познато је да глукокортикоиди имају полувреме елиминације од приближно 3 сата, што захтева њихово често дозирање. Последице, ово узрокује велике концентрације ове супстанце у плазми, токсичне споредне ефекте и ниску комплијансу, посебно када се ради о хроничној терапији (Rang и сар. 2005). Стога, алтернативне стратегије које су у могућности да редукују токсичност, омогуће продужене интервале дозирања и користе други пут примене могу бити од клиничке важности у терапији ових болести. Са циљем добијања новог система за продужено/контролисано отпуштање DexP заснованог на мембранама говеђих и свињских еритроцита у овој фази рада ће се:

- Развити методе спектроскопије у видљивој и ултраљубичастој области (UV-VIS), инфрацрвене спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR) и течне хроматографије под ултра високим притиском комбиноване са масеном спектрофотометријом (UHPLC/-HESI-MS/MS) за квалитативну и квантитативну анализу инкапсулираног DexP;
- Оптимизовати процесни параметри (температура, врста пуфера, концентрација активне супстанце, додатак умреживача) за инкапсулацију DexP у мембране говеђих и свињских еритроцита;
- Утврдити како процесни параметри утичу на ефикасност инкапсулације DexP у говеђе, односно свињске еритроцитне духове;
- Утврдити како процесни параметри утичу на карактеристике добијених система DexP-еритроцитна мембрана и то са аспекта:
 - а) расподеле величине честица DexP-еритроцитна мембрана;
 - б) морфолошких карактеристика мембрана еритроцита са инкапсулираним DexP коришћењем различитих микроскопских техника;
 - в) кинетике ослобађања инкапсулираног DexP из духов.

Последњих година објављени су резултати већег броја истраживања која се са различитих аспеката баве могућом употребом еритроцита/еритроцитних духов као система за продужено ослобађање лековитих супстанци. У даљем тексту наведени су само неки од њих, који су представљали основу за истраживања и експерименте изведене у оквиру израде ове докторске дисертације:

Andrade C.T., Barros L.A.M., Lima M.C.P., Azero E.G.: *Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions*, - International Journal of Biological Macromolecules Vol 34, 2004, pp. 233-240.

Bossa F., Annese V., Valvano M., Latiano A., Martino G., Rossi L., Magnani M., Palmieri O., Serafini S., Damonte G., De Santo E., Andriulli A.: *Erythrocytes-mediated delivery of dexametasone 21-phosphate in steroid-dependent ulcerative colitis : a*

randomized, double-blind Sham-controlled study, - Inflammatory Bowel Diseases Vol 19, 2013, pp. 1872-1879.

Bugarski B., Dovezenski N., Hemofarm Konzern: *Verfahren zur Herstellung von Haemoglobin*, - Deutsches Patentamt DE 19707508, 2000.

Castro M., Rossi L., Papadatou B., Bracci F., Knafelz D., Ambrosini M., Calce A., Serafini S., Isacchi G., Mambrini G., Magnani M.: *Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexametasone 21-phosphate in pedriatic patients affected by steroid depended Crohn disease*, - Journal of Pedriatic Gastroenterology and Nutrition Vol 44, 2007, pp. 423-426.

Danon D.: *Osmotic hemolysis by a gradual decrease in the ionic strength of the surrounding medium*, - Journal of Cellular and Comparative Physiology Vol 57, 1961, pp. 111-117.

Foroozesh M., Hamidi M., Zarrin A., Mohammadi-Samani S., Montaseri H.: *Preparation and in-vitro carактерization of tramadol-loaded erythrocyte carriers for long-term intravenous delivery*, - Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol 63, 2010, pp. 322-332.

Hamidi M., Tajerzadeh H.: *Carrier Erythrocytes: An Overview*, - Drug Delivery Vol 10, 2003, pp. 9-20.

Hamidi M., Tajerzadeh H.: *In vitro carактерization of human intact erythrocytes loaded by enalaprilat*, - Drug Delivery Vol 8, 2001, pp. 223-230.

Harris F.M., Smith S.K., Bell J.D.: *Physical properties of erythrocyte ghosts that determine susceptibility to secretory phospholipase A*, - The Journal of Biological Chemistry Vol 276, 2001, pp. 22722-22731.

Mansouri S., Merhi Y., Winnik F.M., Tabrizian M.: *Investigation of layer-by-layer assembly of polyelectrolytes on fully functional human red blood cells in suspension for attenuated immune response*, - Biomacromolecules Vol 12, 2011, pp. 585-592.

Millán G., Marinero M., Castañeda A., Lanao M.: *Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers*, -Journal of Controled Release Vol 95, 2004, pp. 27-49.

Muzykantov V.: *Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature*, - Expert Opinion in Drug Delivery Vol 7, 2010, 403-427.

Pierigè F., Serafini S., Rossi L., Magnani M.: *Cell-based drug delivery*, - Advanced Drug Delivery Reviews Vol 60, 2008, pp. 286–295.

Rang H.P., Dale M.N., Ritter J.M, Moore P.K., Farmakologija, 5. izdanje, Data status, Beograd, 2005, 411-418.

Rossi L., Castro M., D'Orio F., Damonte G., Serafini S., Bigi L., Panzani I., Novelli G., Dellapiccola B., Panunzi S., Di Carlo P., Bella S., Magnani M.: *Low doses of dexametasone constantly delivered by autologous erythrocytes slow the progression of lung desease in cystic fibrosis patients*, - Blood cells, Molecules and Diseases Vol 33, 2004, pp. 57-63.

Rossi L., Serafini S., Cenerini L., Picardi F., Bigi L., Panzani I., Magnani M.: *Erythrocyte-mediated delivery of dexametasone in patients with chronic obstructive pulmonary desease*, - Biotechnology and Applied Biochemistry Vol 33, 2001, pp. 85-89.

Shaillender M., Luo R., Venkatraman S.S., Neu B.: *Layer-by-layer microcapsules templated on erythrocyte ghost carriers*, - International Journal of Pharmaceutics Vol 415, 2011, pp. 211-217.

Sternberg N., Georgieva R., Duft K., Baumler H.: *Surface-modified loaded human red blood cells for targeting and delivery of drugs*, - Journal of Microencapsulation Vol 52, 2011, pp. 1-12.

Stojanović R., Ilić V., Manojlović V., Bugarski D., Dević M., Bugarski B.: *Isolation of haemoglobin from bovine erythrocytes by controlled hemolysis in the membrane bioreactor*, - Applied Biochemistry and Biotechnology Vol 166, 2012, pp. 1491-1506.

Toldra F., Aristoy M., Mora L., Reig M.: *Innovations in value addition of edible meat by-products*. Meat Science Vol 92, 2012, pp. 290-296.

Vitvitsky V.M., Frolova E.V., Martinov M.V., Komarova S.V., Ataullakhanov F.I.: *Anion permeability and erythrocyte swelling*, - Bioelectrochemistry Vol 52, 2000, pp 169-177.

3. ПОЛАЗНЕ ХИПОТЕЗЕ

Израда предложене тезе базира се на неколико полазних хипотеза. У сарадњи Института за медицинска истраживања и Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду развијен је поступак за изоловање ултрапречишћеног хемоглобина из престарелих хуманих еритроцита процесом градуалне хемоллизе у оригинално дизајнираном мембранском реактору (Бугарски и Довезенски 2000). Описани поступак градуалне хемоллизе поједностављује пречишћавање хемоглобина пореклом из престарелих хуманих еритроцита. Претпоставили смо да се исти поступак, оптимизован у складу са осмотским карактеристикама говеђих и свињских еритроцита, може применити и за изоловање мембрана еритроцита из кланичне крви.

Примена аутологих хуманих еритроцита као система са продуженим/контролисаним ослобађањем најшире коришћеног антиинфламаторног лека дексаметазона позната је и документована већ дуги низ година. У претходној деценији, у клиничкој пракси забележено је више успешних интервенција на бази формулација DexP-у-хуманим еритроцитима у терапији тешких, а истовремено и веома учесталих болести: хроничне обструктивне болести плућа, цистичне фиброзе, Кронове болести и улцеративног колитиса (Rossi и сар. 2001; Rossi и сар. 2004; Bossa и сар. 2013). Иако је показана успешна примена аутологих еритроцита као ефикасних система за испоруку и продужено ослобађање лекова, још није довољно испитана могућност коришћења и ксеногених еритроцита. Технологија која би омогућила коришћење ксеногених (животињских) еритроцита би била од великог значаја. Ксеногени еритроцити из отпадне говеђе и свињске кланичне крви би били повољан стартни материјал у производњи система за испоруку и продужено ослобађање лекова, јер су доступни у великим количинама. Поред доступности у великим количинама, битно је нагласити да животиње пре клања обавезно пролазе све неопходне здравствене прегледе и након чега се проглашавају безбедном полазном сировином за добијање производа који се могу користити за људску исхрану. Још једна велика предност коришћења говеђих и свињских еритроцита лежи у чињеници, да они као и еритроцити свих сисара, за разлику од неких других животињских еритроцита (нпр. живинских еритроцита), немају једро ни друге органеле, па је изоловање мембрана из њих много мање компликовано. Због тога ће се у овој докторској тези мембране еритроцита из свињске и говеђе кланичне крви изоловати оптимизованим процесом градуалне хемоллизе у количинама које за најмање два реда величине превазилазе оне описане у досадашњој литератури (Foroozesh и сар. 2011; Sternberg и сар. 2012; Narisa и сар. 2012).

4. НАУЧНЕ МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Почетни биолошки материјал из кога ће се изоловани еритроцити биће отпадна кланична крв говеда расе Holstein-Friesian и свиња расе Swedish Landrace. За потребе израде ове докторске дисертације отпадну крв ће донирати кланице "Амбар" из Београда и "ПКБ Имес" из Београда. Ове кланице спроводе транспорт животиња и третман у кланици у складу са Законом о добробити животиња Републике Србије.

У раду ће бити примењене следеће методе: За одређивање вредности основних хематолошких параметра изолованих еритроцита (укупан број, концентрација хемоглобина, хематокрит, просечна запремина еритроцита, просечна количина хемоглобина по еритроциту, просечна концентрација хемоглобина по еритроциту) биће примењене стандарне лабораторијске методе (Wintrobe 1981); Осмотска осетљивост еритроцита биће испитивана стандардним лабораторијским тестом осмотске фрагилности по методи коју је развио Beutler (1983); Степен осмотског бубрења ће бити одређен методом коју су описали Vitvitsky и сар. (2000), а модификовали Стојановић и сар. (2012), као и методом проточне цитометрије (Piagnerelli и сар. 2007); Мембране еритроцита биће изоловане градуалном хемолизом, процесом који је модификован у односу на онај који су развили Стојановић и сар. (2012); Морфолошке особине интактних еритроцита и изолованих мембрана еритроцита анализираће се методама фазно-контрастне светлосне микроскопије, скенирајуће електронске микроскопије (FE-SEM) и микроскопије атомских сила (AFM); Методом ласерске дифракције одредиће се величина и расподела величине интактних еритроцита и еритроцитних духова; Протеински састав духова еритроцита биће анализиран електрофорезом у гелу полиакриламида (Laemlli 1970); Концентрација холестерола у мембрани интактних еритроцита и у духовима еритроцита биће рађена ензимским-колориметријским есејом заснованим на Триндеровој „end point“ реакцији (Ferraz и сар. 2004); Испољавање фосфатидилсерина у спољашњем слоју мембране еритроцита и еритроцитних духова као мера реорганизације липидног двослоја, биће процењивано методом проточне цитометрије, на основу интензитета везивања флуоресцентно обележеног протеина Анексина V; Укупни антиоксидативни капацитет интактних еритроцита и духова еритроцита ће бити одређен FRAP есејом (Benzie и Strain, 1999); Инкапсулација DexP у духове еритроцита ће се радити комбинацијом метода градуале хемолизе (Стојановић и сар. 2012) и модификоване методе за затварање еритроцитних духова (након отварања ради отпуштања хемоглобина) коју су описали Foerozesh и сар. (2011); Квалитативна и квантитативна анализа DexP инкапсулираног у говеђе и свињске еритроцитне духове и кинетика његовог ослабања ће бити урађена тачном хроматографијом под ултра високим притиском са масеном спектрофотометријом (UHPLC/-HESI-MS/MS); Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR) ће се користити за доказивање присуства DexP у духовима еритроцита и за испитивање хемијске интеракције DexP и структурних компоненти духова.

5. ОЧЕКИВАНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

Очекује се да ће резултати истраживања у оквиру ове докторске тезе:

- указати у којој мери су мембране еритроцита (духови), изоловане процесом градуалне хемолизе из отпадне свињске и говеђе кланичне крви, на основу својих морфолошких и биохемијских карактеристика погодне као полазна сировина за производњу система за контролисану и продужену испоруку активних супстанци;
- показати у којој мери су духови еритроцита изоловани из свињске и говеђе кланичне крви, на основу података о ефикасности инкапсулације DexP и кинетици његовог отпуштања, погодни за примену као системи за контролисано/продужено отпуштање дексаметазона;
- допринети конципирању савремених биотехнолошких терапијских приступа у лечењу инфламаторних болести;
- помоћи у конверзији животињских споредних производа у кључне компоненте научног, медицинског и технолошког напретка и знатно смањити загађење животне средине.

6. ПЛАН ИСТРАЖИВАЊА И СТРУКТУРА РАДА

Предвиђа се да предложена докторска дисертација буде организована по следећим поглављима: *Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература.*

У поглављу *Увод* биће дефинисани основни циљеви и предмет истраживања, као и научни допринос рада.

Теоријски део докторске дисертације обухватиће преглед и анализу доступне литературе која се односи на:

- а) Савремене трендове у погледу система са продуженим/контролисаним ослобађањем активних супстанци базираних на ћелијама;
- б) Еритроците и еритроцитне мембране као носаче активних супстанци;
- в) Могућност примене отпадне кланичне говеђе и свињске крви као извора еритроцитних мембрани;
- г) Методе за инкапсулацију биолошки активних супстанци у еритроцитне мембране;
- д) Дексаметазон-натријум фосфат као активна супстанца - кандидат за инкапсулацију.

У *Експерименталном делу* биће наведени материјали и методе примењене у експерименталном раду:

- а) хемикалије и материјали употребљени у раду,
- б) опис експерименталних техника за испитивање осмотских и биохемијских особина еритроцита и еритроцитних мембрана изолованих из кланичне крви

- в) опис процесних услова за изоловање и инкапсулацију еритроцитних мембрана из кланичне крви
- г) опис поступака и метода за карактеризацију инкапсулираних еритроцитних мембрана.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће представљени и дискутовани резултати експеримената:

- а) анализе осмотских особина говеђих и свињских еритроцита изолованих из отпадне кланичне крви,
- б) морфолошке и биохемијске карактеризације еритроцитних мембрана изолованих градуалном хемолизом из говеђе и свињске кланичне крви,
- в) оптимизација инкапсулација дексаметазон-натријум фосфата у еритроцитне духове из говеђе и свињске кланичне крви: испитивања утицаја температуре инкубације, различите концентрације лека и додавања агенаса за умрежавање на ефикасност инкапсулације дексаметазон-натријум фосфата
- г) праћења кинетике отпуштања дексаметазон-натријум фосфата из говеђих и свињских еритроцитних духов
- д) критички осврт на остварене предности и евентуалне недостатке/проблеме инкапсулације дексаметазон-натријум фосфата у говеђе и свињске еритроцитне духове пореклом из кланичне крви, са посебним освртом на економски аспект и применљивост добијених резултата у биотехнолошком приступу у медицини и фармацији.

У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз наглашавање њихових основних доприноса.

Литература ће садржати наводе цитиране у раду и публикације проистекле из истраживачког рада ове докторске тезе.

7. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу изложеног Комисија сматра да је тема докторске дисертације коју је предложила Ивана Т. Костић, дипл. фарм., научно заснована и да представља значајан допринос научној области ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Ивани Т. Костић одобри израду докторске дисертације под насловом **„ПРОЦЕСНО ОЧУВАНЕ МЕМБРАНЕ ЕРИТРОЦИТА ДОБИЈЕНЕ ИЗ КЛАНИЧНЕ КРВИ КАО СИСТЕМИ ЗА ПРОДУЖЕНО ОСЛОБАЂАЊЕ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ”**.

За ментора докторске дисертације Комисија предлаже др Бранка Бугарског, редовног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, а за коментора др Весну Илић, научног саветника Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду.

У Београду, 25.08.2014. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Бранко Бугарски
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Весна Илић, научни саветник
Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања

Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Верица Ђорђевић, научни сарадник
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет