

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Иване Т. Костић**, дипл. фарм.

Одлуком 35/19 бр. од 22. 01. 2015. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Иване Т. Костић**, дипл. фарм. под насловом

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

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

16.06.2014. – Кандидат Ивана Т. Костић дипл. фарм., предложила је тему докторске дисертације под називом: "Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци".

26.06.2014. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/175 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Ивана Т. Костић, дипл. фарм. за израду докторске дисертације под називом: "Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци".

11.09.2014. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/204 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Иване Т. Костић, дипл. фарм., под називом: "Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци", а за менторе ове докторске дисертације су именовани др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду и др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду.

20.10.2014. – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Иване Т. Костић дипл. фарм., под називом: "Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци".

22.01.2015. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/19 о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Иване Т. Костић дипл. фарм., под називом: "Процесно

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

Кандидат Ивана Т. Костић, дипл. фарм., уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2009/2010 године.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду. За менторе ове докторске дисертације су именовани др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду и др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду.

Ментор др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду је до сада из ове области публиковао пет радова у часописима који су на СЦИ листи и један патент. Руководио је изразом шест одбрањених докторских дисертација, што говори о компетентности ментора да руководи изразом ове докторске дисертације.

Ментор др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, је до сада из ове области публиковала пет радова у часописима који су на СЦИ листи. Званично је била члан једне комисије одбрањене докторске дисертације, а као члан истраживачког тима учествовала у реализацији још три докторске дисертације, што је документовано у захвалници ових докторских дисертација, и резултирало објављивањем четири публикације категорије M21, што говори о компетенцији ментора да руководи изразом ове докторске дисертације.

1.2. Биографски подаци о кандидату

Кандидат **Ивана (Томислав) Костић**, дипломирани фармацеут, рођена је 13. децембра 1984. године у Београду. На Фармацеутском факултету Универзитета у Београду дипломирала је 2009. године, са просечном оценом 9,29, на катедри за Фармацеутску технологију и козметологију. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је школске 2009/2010. Године. 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.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Иване Т. Костић, дипл. фарм., садржи 176 страна (од којих је 159 нумерисано) у оквиру којих се налази 8 поглавља, са укупно 53 слике, 12 табела и 207 литературних навода. Докторска дисертација садржи: Увод, Теоријски део, Циљ рада, Експериментални део, Резултате, Дискусију, Закључак, Литературу и Прилог. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. По својој форми и садржају, поднети рад задовољава све стандарде Универзитета у Београду за докторску дисертацију.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводу (поглавље I) су образложени предмет и циљеви истраживања, као и научни допринос докторске тезе. У оквиру Теоријског дела дисертације (поглавље II) дат је литературни преглед предметне области, изложен кроз девет подпоглавља. Дат је преглед савремених система за продужено/контролисано ослобађање активних супстанци базираних на ћелијама. Детаљно су описани различити приступи у развоју формулација на бази еритроцита и еритроцитних мембрана као носача лекова, са посебним освртом на инкапсулацију биолошки активних супстанци у еритроците и еритроцитне мембране. Приказане су постојеће технике за инкапсулацију биолошки активних супстанци у еритроците и еритроцитне мембране, као и детаљан преглед биолошки активних супстанци које су до сада инкапсулиране у еритроцитне мембране. Дат је посебан осврт на могућност коришћења отпадне кланичне крви из месне индустрије, као извора еритроцитних мембрана, и на оправданост коришћења дексаметазона-натријум-фосфата као активне супстанце. Дат је детаљан преглед литературе која описује тренутно стање у области система за продужено ослобађање дексаметазон-натријум-фосфата. Циљеви рада изложени су у поглављу III.

У експерименталном делу дисертације (поглавље IV) описани су материјали и методе, према редоследу експерименталног истраживачког рада. Прво су описане методе одређивања основних хематолошких параметра говеђих и свињских еритроцита отпадне кланичне крви, испитивања њихове отпорности на осмотску хемолизу и дефинисања степена осмотског бубрења говеђих и свињских еритроцита. Даље је описано оптимизовање параметара процеса градуалне хемолизе за изоловање мембрана говеђих и свињских еритроцита, испитивање расподеле величине свињских и говеђих еритроцита и мембрана еритроцита (еритроцитних духов) добијених градуалном хемолизом, као и методе за испитивање утицаја процесних параметара на хемијски састав и структурно уређење добијених мембрана. Описана је процедура коришћена за инкапсулацију дексаметазон-натријум-фосфата у еритроцитне мембране. Поред тога, описана је и метода којом је вршено квантитативно утврђивање инкапсулираног дексаметазона-натријум-фосфата у еритроцитне мембране, и праћени утицај процесних параметара и кинетика отпуштања инкапсулираног лека.

Резултати су приказани у поглављу V, а дискутовани у поглављу VI. У првој фази рада, 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, дефинисане су специфичне осмотске карактеристике ових еритроцита. Као оптимални пуфер за извођење хемолизе говеђих и свињских еритроцита одређен је 35 mM натријум-фосфатни/NaCl пуфер чијом применом у процесу градуалне хипотоничне хемолизе (при протоку пуфера од 300 ml/h, током 30 min) се ослобађа >90% хемоглобина из велике запремине (100 ml) обе врсте еритроцита. Испитан је утицај

процесних параметара на морфологију и биохемијски састав (садржај липида, протеина, оксидативна својства итд.), тј. структурно уређење добијених мембрана. Након дефинисања основних морфолошких и биохемијских карактеристика мембрана еритроцита добијених процесом градуалне хемолизе, у следећој фази истраживања испитана је могућност примене овог поступка за инкапсулацију модел супстанце, синтетског глукокортикоида и најшире коришћеног антиинфламаторног лека, дексаметазон-натријум-фосфата (DexP). Оптимизовани су процесни параметри за инкапсулацију DexP у мембране говеђих и свињских еритроцита. Од испитиваних параметара као најоптималнији за инкапсулацију DexP, у обе врсте еритроцитних духов, одређени су концентрација лека од 0,12 mg/ml и температура инкубације од 37°C. Показано је да се коришћењем свињских еритроцитних духов, постиже већи ниво инкапсулације DexP у поређењу са говеђим еритроцитним духовима. Добијени системи DexP-еритроцитне мембране су окарактерисани са аспекта расподеле величине, морфолошких карактеристика мембрана еритроцита са инкапсулираним DexP (коришћењем различитих микроскопских техника) и кинетике ослобађања инкапсулираног DexP из духов. Показано је да присуство инкапсулираног DexP нема утицаја на морфологију еритроцитних духов, али да постоје значајне разлике у морфологији између говеђих и свињских еритроцитних духов, на основу чега се може очекивати различито понашање ове две испитиване врсте еритроцитних духов као носача DexP. Кинетика отпуштања инкапсулираног DexP се разликовала како између врста еритроцитних духов, тако и између узорака исте врсте у зависности од садржаја резидуалног хемоглобина. Постигнуто је продужено отпуштање DexP, у периоду од 3, односно 5 дана у случају DexP инкапсулираних свињских и говеђих еритроцитних духов, респективно.

У поглављу VII таксативно су приказани најважнији закључци, изведени на основу испитивања изложених у претходним поглављима У поглављу VIII наведене су референце коришћене током израде докторске дисертације.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Докторска дисертација Иване Т. Костић за предмет има савремену тему истраживања система за продужено/контролисано ослобађање лекова и могућности употребе ксеногених (животињских) еритроцитних мембрана као носача антиинфламаторног лека DexP. Сам избор DexP, као модел супстанце је научно (али и са становишта практичне примене) добро утемељен имајући у виду глобални (али и за нас много битнији, локални) пораст инциденце аутоимуних/инфламаторних болести код којих је дексаметазон лек првог избора, али и истовремено лек за који се због својих бројних нежељених дејстава које испољава, интензивно трага за носачем—биолошком мембраном или синтетским полимером — који би омогућио његово продужено и контролисано отпуштање и последичну примену мањих доза лека и смањење нежељених ефеката.

Иако је у литератури показана успешна примена аутологих еритроцита као ефикасних система за испоруку и продужено ослобађање DexP, још није довољно испитана могућност коришћења и ксеногених (животињских) еритроцита. Технологија која омогућава коришћење ксеногених еритроцита је од великог значаја. Ксеногени еритроцити из отпадне говеђе и свињске кланичне крви су повољан стартни материјал у производњи система за испоруку и продужено ослобађање лекова, јер су доступни у

великим количинама. Због тога су у овој докторској тези мембране еритроцита из свињске и говеђе кланичне крви изоловане оптимизованим процесом градуалне хемолизе у количинама које за најмање два реда величине превазилазе оне описане у досадашњој литератури. Поред доступности у великим количинама, битно је нагласити да животиње пре клања обавезно пролазе све неопходне здравствене прегледе, након чега се проглашавају безбедном полазном сировином за добијање производа који се могу користити за људску исхрану. Међутим уколико се кланична крв, као најобилнији споредни производ месне индустрије, адекватно не третира (што је случај са земљама у региону) она представља и озбиљан биохазард. Зато истраживања у оквиру ове докторске дисертације имају и еколошки значај кроз примену савременог приступа да се од „отпада“ добије нови производ. Тако, добијени системи на бази еритроцитних мембрана из кланичне крви са продуженим отпуштањем DexP, представљају оригинални производ са додатом вредношћу. Резултати ове докторске дисертације пружају и смернице за будућа истраживања фармацеутско-технолошких и биомедицинских области. На основу опсежног прегледа литературе, може се закључити да се истраживања у оквиру ове докторске дисертације уклапају у светске трендове и указују на значај и актуелност проучавање проблематике.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације кандидата Иване Т. Костић, цитирано је 207 литературних навода који су омогућили да се прикаже стање у испитиваној области, као и актуелност проблематике. Савремена истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су омогућили добар увид у области примене еритроцитних мембрана као система за испоруку DexP. На основу пажљиве анализе резултата приказаних у научној литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из наведене литературе која је коришћена у истраживању, уочава се изузетно велико познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове дисертације су доказани одговарајућим експериментима, као и савременим аналитичким инструменталним мерењима према оригиналним или модификованим методама из литературе. Поред стандардних хематолошких метода, коришћена су и две методе одређивања степена осмотског бубрења еритроцита. Мембране еритроцита су изоловане градуалном хемолизом, процесом који је оптимизован у складу са осмотским карактеристикама полазних еритроцита из кланичне крви. Морфолошке особине интактних еритроцита и изолованих мембрана еритроцита анализирани су методама фазно-контрастне светлосне микроскопије, скенирајуће електронске микроскопије (FE-SEM) и микроскопије атомских сила (AFM), као и методом ласерске дифракције. Биохемијски састав и структурно уређење мембрана еритроцита, анализирани су: електрофорезом у гелу полиакриламида, ензимским-колориметријским есејом заснованим на Триндеровој „end point“ реакцији и методом проточне цитометрије, на основу интензитета везивања флуоресцентно обележеног протеина Анексина V. Инкапсулација DexP у духове еритроцита је урађена комбинацијом метода градуалне хемолизе и модификоване

методе за затварање еритроцитних духова из литературе. Развијене су методе спектроскопије у видљивој и ултраљубичастој области (UV-VIS), инфрацрвене спектроскопије 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. UHPLC/-HESI-MS/MS праћена је кинетика отпуштања лека из добијених система DexP-еритроцитне мембране.

3.4. Применљивост остварених резултата

Након поређења резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације са до сада објављеним резултатима других истраживачких група, закључили смо да је остварен значајан допринос у развоју нових система базираних на еритроцитним мембранама из кланичне крви за продужену испоруку DexP и то по сопственој технологији. Системи за продужену испоруку DexP који су добијени у оквиру ове тезе имају велики потенцијал биомедицинске примене, од примене у културама ћелија (са циљем стимулације раста и усмеравања диференцијације) до примене у терапијске сврхе широко распрострањених аутоимуних инфламаторних болести. Поред тога, на основу резултата тезе може се предложити још један од начина искоришћавања/трансформације главног споредног производа месне индустрије и биохазарда, кланичне крви, у производ са додатом вредношћу.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Ивана Т. Костић, дипл. фарм. се током израде докторске дисертације зрело и одговорно ухватила у коштац са истраживањима која до сада нису рађена ни у нашој земљи нити у региону. У свом раду испољила је изузетну самосталност, стручност у реализацији експеримената и увођењу и развоју различитих техника и метода, а при анализи и приказивању резултата је показала, систематичност и креативност, али и критичност. Наиме, оно што посебно карактерише Ивану Костић као истраживача јесте велика научна радозналост, из које је увек произилазила жеља и способност да се сви добијени експериментални резултати у потпуности објасне. Кандидат има изузетну склоност ка експерименталном раду и током докторских студија изградила је потребан инжењерски приступ у развоју и реализацији експерименталних техника. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове докторске дисертације се огледају у:

- развоју процеса за изоловање говеђих и свињских еритроцитних мембрана („духова”) из отпадне кланичне крви;
- дефинисању како процесни параметри утичу на хемијски састав, структурно уређење добијених еритроцитних мембрана и морфолошке карактеристике;
- указивању у којој мери су мембране еритроцита, изоловане процесом градуалне хемоллизе из отпадне свињске и говеђе кланичне крви погодне као полазна сировина за производњу система за контролисану и продужену испоруку активних супстанци;
- развоју система за продужено/контролисано ослобађање активних супстанци на бази добијених еритроцитних мембрана;
- дефинисању феномена преноса масе активне супстанце кроз мембране еритроцита и утврђивању утицаја састава мембране на кинетику отпуштања;
- указивању у којој мери су духови еритроцита изоловани из свињске и говеђе кланичне крви, погодни за примену као системи за контролисано/продужено отпуштање активне супстанце дексаметазон-натријум-фосфата;
- доприносу у конципирању савремених биотехнолошких терапијских приступа у лечењу инфламаторних болести;
- представљању још једног процеса који би могао помоћи у конверзији животињских споредних производа у кључне компоненте научног, медицинског и технолошког напретка и знатно смањити загађење животне средине.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Полазећи од добро утемељене идеје у овој докторској дисертацији је показано да се говеђи и свињски еритроцити издвојени из отпадне кланичне крви, због садржаја хемоглобина и величине који одговарају референтним вредностима за здраве животиње, могу користити као полазни материјал за добијање празних мембрана еритроцита. С обзиром да је за добијање мембрана еритроцита и њихову инкапсулацију примењиван поступак хемоллизе, у овој тези су детаљно испитане и осмотске карактеристике говеђих и свињских еритроцита. Показано је да су свињски еритроци осмотски осетљивији, и да еритроци ниједне од испитиваних врста нису осмотски хомогени. Ова хетерогеност је детектована између еритроцита различитих узорака исте врсте, али и еритроцита једног узорка. На основу добијених резултата закључено је да процес градуалне хемоллизе треба изводити хипоосмотским 35 mM натријум-фосфатним/NaCl пуфером, што резултира 90% хемолизом, тј. са више од 90% ослобођеног хемоглобина. Ово је било од значаја, јер је се у процесу може добити хемоглобин, као извор хемског гвожђа. Биохемијска анализа мембрана еритроцита након хемоллизе је показала да се садржај протеина и холестерола није битно разликовао у односу на мембране интактних еритроцита – што је и дало смисленост даљим експериментима јер садржај холестерола и његова интеракција са протеинима мембране и посредно протеинима цитоскелета, дефинише успешност уласка и задржавања активне супстанце у мембрани. Такође, дијаметар еритроцита обе врсте, који је био за свега 10% мањи од интактних еритроцита, а расподела величине

униформна, што је заједно са очуваним општим биохемијским саставом, показало да духови кланичних еритроцита обе врсте животиња имају способност да имитирају хемијско и структурно анизотропно окружење ћелијских мембрана *in vivo*, што је од значаја за дифузију и партициони коефицијет лекова при њиховој инкапсулацији. SEM анализа је показала да се топографија празних мембрана еритроцита (духова) обе врсте одступа од мембране интактних еритроцита. Код обе врсте духова, детектована је измењена текстура површине са израженим наборима и ивагинацијама. Ове промене су биле израженије код свињских духова и доведене су у везу са израженијом реорганизацијом липидног двослоја и повећаним степеном оксидативног оштећења ове врсте духова. Оксидативна оштећења мембране и реорганизација липидног двослоја нису биле „нежељене“ особине, јер представљају физиолошки сигнал за уклањање еритроцита у макрофагима слезине и јетре, услед чега овакви духови могу бити коришћени за циљану испоруку лекова у ове органе.

Иако је до сада публикован већи број радова о релативно успешној инкапсулацији лекова у хумане еритроците, у свим досадашњим истраживањима почетна запремина еритроцита није прелазила 1 ml. Према нашем сазнању, ова докторска дисертација је јединствена студија и по томе што је продуктивност развијеног процеса износила 50 ml препарата по шаржи (од полазних 100 ml еритроцита), што се у фармацеутским круговима сматра пилот-нивоом. У поређењу са другим методама за инкапсулацију активних супстанци у еритроцитне мембране који су описани у литератури, градуална хипотонична хемолиза је нов процес који се базира на принципима неколико метода – хипотоничне хемоллизе, хипотоничне дилуције, хипотоничне дијализе. Предност градуалне хипотоничне хемоллизе је што не захтева скупу посебну дизајнирану опрему, као што је то случај са неким другим методама (нпр. хипотоничне дијализе).

Потврда присуства DexP након прелиминарне инкапсулације у говеђе и свињске еритроцитне духове градуалном хемолизом урађена је FTIR анализом, којом је показана појава DexP у спектрима говеђих и свињских духова са инкапсулираним DexP. Поред тога овом анализом је показано да инкапсулација DexP за последицу има и повећану уређеност мембране еритроцита обе испитиване врсте. FTIR анализа је указала на бољу ефикасност инкапсулације свињских у односу на говеђе еритроцитне духове. Међутим, због комплексне хемијске структуре испитиваних еритроцитних духова и могуће дефосфорилације DexP под утицајем ензима еритроцита и превођења до дексаметазона (Dex) основни предуслов за даљи рад је био развој аналитичког поступка за апсолутну идентификацију и квантификацију инкапсулираног лека. Због тога је за потребе ове дисертације, за идентификацију, квантификацију и апсолутно разликовање DexP и Dex, развијена и валидирана метода течне хроматографије под ултра високим притиском у спрези са MS/MS масеном спектрофотометријом (UHPLC/-HESI-MS/MS). Ова метода је била неопходна не само за детекцију инкапсулираног DexP већ и оптимизацију инкапсулационих параметара (почетна концентрација лека, температуре инкубације, додаток глутаралдехида), као и праћење кинетике отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова.

Испитивањем утицаја процесних параметара на ефикасност инкапсулације DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове, показано је да инкубација на 37°C резултује у статистички значајно повећаној количини инкапсулираног DexP у еритроцитним духовима, при чему су значајно веће количине DexP детектоване у свињским еритроцитним духовима. Поред тога, инкапсулација DexP у обе врсте еритроцитних духова директно пропорционално порасту концентрације лека у пуферу за инкубацију, у опсегу концентрације од 0,04 – 0,12 mg/ml.

Метода ласерске дифракције је показала да поступак инкапсулације DexP градуалном хипотоничном хемолизом није утицао на величину и униформност расподеле еритроцитних духова обе врсте. Овај резултат су повтрдиле и SEM и AFM анализе. Ипак, AFM анализа је показала постојање значајне разлике у морфологији између говеђих и свињских еритроцитних духова (и контролних и са инкапсулираним леком), што може утицати на карактеристике ове две врсте еритроцитних духова као носача DexP.

Кинетика отпуштања инкапсулираног DexP се значајно разликовала између врста испитиваних узорака еритроцитних духова. Говеђи еритроцитни духови за разлику од свињских еритроцитних духова показали су мултифазну кинетику отпуштања инкапсулираног DexP. Код обе врсте еритроцитних духова, постојање lag-фазе показује да су у процес ослобађања лека из духова, поред дифузије укључене и неке структурне промене ћелијске мембране. Ефикасност духова свињских и говеђих еритроцита како носача лекова потврђено је на основу резултата који су потврдили споро тј. продужено отпуштање DexP, у периоду од три дана, код DexP инкапсулираних свињских духова, односно пет дана код говеђих еритроцитних духова. Кинетика ослобађања DexP из еритроцитних духова, показала је да је већи DexP ефлукс добијен у случају оба типа узорака са већим садржајем резидуалног хемоглобина што је било у складу са торијом других аутора да је ослобађање лека из хуманих еритроцитних носача поспешено истовременим отпуштањем/ефлуksom хемоглобина.

На основу добијених морфолошких и структурних карактеристика и карактеристика отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова изолованих из кланичне крви, може се закључити да они показују велики потенцијал за биомедицинску примену у циљу продужене и контролисане доставе антиинфламаторног лека DexP. Као и свако добро изведено истраживање и ово је открило нове правце истраживања у смислу даљег дизајнирања еритроцитних духова као носача лекова, пре свега облагање еритроцитних духова слојевима различитих полимера - ради постизања ефикасније инкапсулације и боље контролисаног отпуштања лека, као и маскирања антигених детерминанти са циљем добијања носача који би био погодан за примену код већег броја врсти сисара. Такође, отвара се као неопходан правац испитивања ефикасности DexP као система за продужену испоруку лекова у *in vitro* и *in vivo* условима са крајњим циљем његове клиничке примене.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Ивана Т. Костић је резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног и националног значаја и саопштавањем радова на међународним и националним скуповима. Резултати досадашњег научно-истраживачког рада кандидата у овој области приказани су у 3 (три) рада објављена у научним часописима међународног значаја (ознака групе M20: врста резултата M21-1 рад; M23-2 рада), 12 (дванаест) радова објављених у зборницима скупова међународног значаја штампана у целини и изводу (ознака групе M30: врста резултата M33, 5 радова, M34 седам радова), 1 (један) рад објављен у домаћем научном часопису (ознака групе M50: врста резултата M53, 1 рад), 2 (два) рада објављена у зборнику скупа домаћег значаја штампаног у изводу (ознака групе M60: врста резултата M64, 2 рада).

Списак радова који су резултат истраживања у оквиру докторске дисертације

Категорија 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, pp. 250-259, 2014 (**IF** = **4.287**; Наука о материјалима, Биоматеријали, 7/32, 2013) (ISSN 0927-7765).

Категорија M23:

1. **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*, vol. 69, no. 1, pp. 67-76, 2014 (**IF** = **0.562**, Хемијско инжењерство, 92/133, 2013) (ISSN 0367-598X).

Категорија M33:

1. **Kostić, I.T.**, Bukara, K.S., Pravilović, R., Ilić, V.Lj., Mojsilović, S.B., Marković, S.D., Bugarski, B.M.: "Morphological characterization of erythrocyte membranes derived from bovine and porcine slaughterhouse blood as dexamethasone sodium phosphate carriers", - *Proceedings of the IV International congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"* Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4-6 March 2015, pp. 312-317. ISBN 978-99955-81-17-6

2. **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 III International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Hercegovina, 4-6 March 2013, pp. 153-166. ISBN 978-99955-81-11-4

Категорија M34:

1. **Kostić, I.**, Bukara, K., Ilić, V., Šekularac, G., Mišić, D., Nedović, V., Bugarski, B.: "From meat industry waste to potential active substances carriers: Erythrocyte ghosts from slaughterhouse blood as dexamethasone sodium phosphate carriers", - *Book of abstracts of the II International Congress of Food Technology, Quality and Safety (Food Tech Congress)*, Novi Sad, Serbia, 28-30 October 2014, pp.176-178. ISBN 978-86-7994-041-4

2. **Kostić, I.T.**, Bukara, K.M., Ilić, V.L., Veljović, Đ.N., Bugarski, B.M.: "Morphology and protein composition of porcine erythrocyte ghosts altered by different buffers", - *Proceedings of the 18th International Microscopy Congress*, Prague, Czech Republic 7-12 September, 2014, ID-1-P-1469. ISBN 978-80-260-6720-7

3. **Kostić, I.T.**, Bukara, K.M., Ilić, V.L., Ralević, U.M., Bugarski, B.M.: "Preparation of erythrocyte ghosts from slaughterhouse blood for AFM observation", - *Proceedings of the 18th International Microscopy Congress*, Prague, Czech Republic 7-12 September, 2014, ID-1-P-1470. ISBN 978-80-260-6720-7

4. **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"*, Bucharest, Romania, 27-28 February 2014, pp. 36-37. ISBN 978-973-8937-80-2

5. **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*, Regensburg, Germany, 25-30 August, 2013, pp. 520-521. urn:nbn:de:bvb:355-epub-287343

Категорија M53:

1. **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, pp. 287-292, 2012 (ISSN 1821-1585)

Категорија M64:

1. Bukara, K.S., **Kostić, I.T.**, Ilić, V.Lj., Stančić, A., Bugarski, B.M.: "Usage of erythrocyte membranes from slaughterhouse blood as controlled drug delivery systems-example of dexamethasone",- *Book of abstracts of Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students*, Belgrade, Serbia, 15-18 January, 2015, PP20.

Други радови који су проистекли из доктората:

Категорија M23:

1. 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, pp. 519–529, 2012 (**IF = 0.463**; Хемијско инжењерство, 104/133, 2012) (ISSN 0367-598X).

Категорија M33:

1. Bukara, K.S., **Kostić, I.T.**, Pravilović, R., Kalušević, A., Ilić, V.Lj., Marković, S.D., Bugarski, B.M.: "Termoprotective effect of maltose on hemoglobin isolated from porcine slaughterhouse blood and outdated human red blood cells", -*Proceedings of the IV International congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"* Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, 4-6 March 2015, pp. 336-339. ISBN 978-99955-81-17-6

2. **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"*, Belgrade, Serbia, 10-12 June 2013, pp. 201-205. ISBN 978-86 - 7994 7994 -041 -4

3. **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*, Novi Sad, Serbia, 23-26 May 2012, pp. 1639-1644. ISBN 978-86-7994-027-8

Категорија M34:

1. Bukara, K.S., **Kostić, I.T.**, Ilić, V.Lj., Marković, S.B., Lazarević, N.Ž., Bugarski, B.M.: "Solid state characterization of maltose-embedded hemoglobin from porcine slaughterhouse blood", - *Book of abstracts of the Thirteenth Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering*, Belgrade, Serbia December 10-12, 2014, I/4 pp.2. ISBN 978-86-80321-30-1

2. 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*, Athens, Greece, 12-13 May 2014, pp. 16-17.

Категорија M64:

1. Bukara, K.S., **Kostić, I.T.**, Ilić, V.Lj., Stančić, A., Bugarski, B.M.: "Solid state characterization of maltose-embedded hemoglobin from porcine slaughterhouse blood",- *Book of abstracts of Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students*, Belgrade, Serbia, 15-18 January 2015, OP6

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата **Иване Т. Костић, дипл. фарм.**, под насловом **"Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци"** представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног и домаћег значаја. Предмет и циљеви који су постављени су јасно наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да докторска дисертација под називом **"Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци"** у потпуности испуњава све захтеване критеријуме као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно истраживачку способност у свим фазама израде ове дисертације.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати овај Реферат, пружи на увид јавности поднету докторску дисертацију кандидата **Иване Т. Костић, дипл. фарм.** у законом предвиђеном року, као и да Реферат упути Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 31.03. 2015. 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

Проф. др Виктор Недовић
Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет

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