

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET

U Beogradu, 24. februar 2017.

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 26. januara 2017. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Mirjana Đukić - mentor rada i predsednik Komisije, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr sc. Milica Ninković - mentor rada, vanredni profesor, Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Beograd
3. Dr sc. Dragana Vujanović - vanredni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. Dr sc. Danijela Đukić-Ćosić - docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
5. Dr sc. Milena Simić - docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Interferencija tiolnih grupa metabolita disulfirama sa glutationskim odgovorom na oksidativni stres indukovani kadmijumom i/ili alkoholom u jetri pacova**“ kandidata mr Aide Begić. Na osnovu analize priložene doktorske disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mr Aide Begić pod nazivom „**Interferencija tiolnih grupa metabolita disulfirama sa glutationskim odgovorom na oksidativni stres indukovani kadmijumom i/ili alkoholom u jetri pacova**“ napisana je na 135 strana kucanog teksta formata A4, fontom *Times New Roman*, veličine 12 i proredom 1,5. Disertacija se sastoji iz sledećih

celina: 1. Uvod, 2. Hipoteza i cilj istraživanja, 3. Materijal i metode, 4. Rezultati, 5. Diskusija, 6. Zaključak, 7. Literatura, 8. Prilozi.

Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Disertacije je napisana jasnim jezičkim stilom i sadrži 22 grafika, 9 slika (osim Slika 1,6 i 9 ostale slike imaju podslike: Slika 2 A-H; Slika 3 A-E; Slike 4,5,7 i 8 imaju po dve podslike A-B) i 14 tabela u Rezultatima; 17 tabela u Prilogu; i 123 literaturnih navoda.

U **uvodu** je dat detaljan prikaz dosadašnjih saznanja iz oblasti koje su neposredno vezane za predmet disertacije i podeljen je u pet odeljaka. U *prvom odeljku pod naslovom Značaj i funkcija jetre i mehanizmi hepatotoksičnosti* opisana je uloga jetre u detoksikacionim procesima, a oksidacioni metabolizam ksenobitoka (posredovan CYP450 enzimskim sistemom) i posledična moguća disfunkcija mitohondrija je dovedena u vezu sa nastankom oksidativnog stresa (OS), te posledičnim pražnjenjem energetske i rezervi glutationa (GSH), uz akumulaciju lipida (steatoza) i posledičnu ćelijsku smrt. Toksikološki značaj *kadmijuma* (Cd), karcinogena prve grupe (IARC grupa 1), kome su pušači posebno inhalaciono izloženi i *etanola* čiji je toksikološki značaj predominantno povezan sa alkoholizmom su opisani u *drugom odnosno trećem odeljku*. Dati su ključni efekti na ciljane organe toksičnosti i povezanost toksičnih mehanizama sa OS. Njihovom toksikokinetikom opisani su stepen i brzina apsorpcije i distribucije (istaknuto je vezivanje Cd za tiolne (-SH) grupe proteina, peptida i drugih komponenti, što i uslovljava akumulaciju Cd u tkivima i depoziciju u ciljnim mjestima), zatim metabolizam (istaknuto je učešće CYP2E1 enzima u oksidacionom metabolizmu etanola) kao i putevi ekskrecije, poluvreme eliminacije, kao i najznačajnije toksikokinetičke karakteristike. U *četvrtom odeljku pisano je o disulfiramu* (DSF) leku koji se koristi u averzivnoj terapiji alkoholizma bazirana na inhibiciji enzima ALDH u jetri i mozgu. Zbog prisustva -SH grupe, metaboliti DSF su prepoznati kao moguća interferencija sa GSH ciklusom, kao i helatni agens, kako za esencijalne, tako i za toksične metale (te i Cd). Opisana je enterhepatična cirkulacija i kompletna farmakokinetika DSF. Dualni efekat DSF na red-oks homeostazu je objašnjen prooksidativni efektom metabolita DSF u smislu moguće tiolizacije proteina, kao i antioksidativni efekat, zbog heliranja metala sa prelaznom i stabilnom valencom, kao i redukcionim osobinama -SH grupe. *Peto poglavlje se bavi GSH* i opisana je sinteza i degradacija GSH, njegova uloga u transdukcija signala (posredovana oksidacijom cisteinskih rezidua proteina), kao i osetljivosti cisteina na oksidaciju, na čemu se bazira njegov antioksidativni efekat. Imajući u vidu da je utrošak GSH na račun stvaranja

oksidacione disulfidne forme (GSSG) tokom OS, istaknut je značaj analitičkog postupka merenja obe forme glutaciona u organizmu u kome je narušena redoks homeostaza.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: 1) postavka animalne studije na pacovima koja imitira uslove humane ekspozicije testiranim agensima u meri u kojoj je to tehnički izvodljivo; 2) procjena funkcionalnog statusa jetre tretiranih pacova (mjerjenje funkcionalnih hepatičkih enzima i histopatologija) tokom i nakon individualne i koekspozicije testiranim agensima; 3) izučavanje statusa esencijalnih bioelemenata i toksičnog Cd pri individualnoj primjeni DSF i u kombinaciji sa Cd pri subakutnoj i/ili subhroničnoj izloženosti pacova etanolu i/ili Cd; 3) izučavanje interferencije –SH grupe DDC-a sa glutationskim ciklusom u sklopu antioksidativnog odgovora na OS posredovanu hepatotoksičnost Cd i/ili etanola u jetri pacova, pri subakutnoj i/ili subhroničnoj ekspoziciji; 4) postavka i optimizacija izokratne HPLC/UV metode za mjerjenje GSH i GSSG uz pojednostavljenu pripremu biološkog uzorka, bez derivatizacionog postupka (uglavnom je prisutan u dostupnim/publikovanim HPLC metodama za merenje glutaciona).

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su navedeni podaci o eksperimentalnim modelima i protokolu ispitivanja. U *in vivo* eksperimentu korišćeni su mužjaci *Wistar* pacova podeljenih na dve kontrolne grupe (n = 6) i 7 eksperimentalnih grupa (n = 24) od kojih je svaka bila podeljena na po 4 podgrupe (n = 6) prema trajanju izloženosti ispitivanim supstancama i/ili kombinaciji supstanci, sa izuzetkom grupe izložene Cd koja je podijeljena u 6 podgrupa. Vreme izloženosti pacova ispitivanim agensima je bilo tokom 1, 3, 10, 21, 31 i 42 dana (subakutna/subhronična ekspozicija), te su ova vremena navedena u subskriptu odgovarajućih grupa. Kontrolnoj grupi životinja su davani voda, odnosno maslinovo ulje kao rastvarač za DSF, a eksperimentalne grupe su: Cd grupa - individualna ekspozicija *i.p.* 1 mg vodenog rastvora CdCl₂/kg t.m./dan u jednoj dozi (Cd₁, Cd₁₋₃, Cd₁₋₁₀, Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₃₁ i Cd₁₋₄₂); A grupe – individualna *per os* izloženost, putem oralne sonde, 3 ml 20% rastvora etanola/dan u dve podeljene doze ujutro i poslijepodne tokom označene (A₁, A₁₋₃, A₁₋₁₀ i A₁₋₂₁); DSF grupe – individualna *per os* subakutna izloženost 178,5 mg DSF/kg t.m./dan u jednoj (DSF₁, DSF₁₋₃, DSF₁₋₁₀ i DSF₁₋₂₁); A/Cd grupe – subakutna kombinovana ekspozicija etanolu i Cd. Na isti način su primenjvani agensi (A₁/Cd₁, A₁₋₃/Cd₁₋₃, A₁₋₁₀/Cd₁₋₁₀ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁); A/DSF grupe - subhronična kombinovana ekspozicija etanolu i DSF. Nakon individualne ekspozicije etanolu tokom 21 dana, koja se potom prekida, daje se DSF (način primene je prethodno naveden)

(subhronična kombinovana ekspozicija) (A_{1-21}/DSF_{22} , A_{1-21}/DSF_{22-24} , A_{1-21}/DSF_{22-31} i A_{1-21}/DSF_{22-42}); Cd/DSF grupe - subhronična kombinovana ekspozicija Cd i DSF (vreme ekspozicije indikovano je u subskriptu, a način davanja je prethodno naveden (Cd_{1-22}/DSF_{22} , Cd_{1-24}/DSF_{22-24} , Cd_{1-31}/DSF_{22-31} i Cd_{1-42}/DSF_{22-42}); i Cd/A/DSF grupe - subhronična kombinovana ekspozicija (paralelna ekspozicija Cd i etanolu otkom 21 dan, a potom Cd i DSF narednih 21 dan) ($A_{1-21}/Cd_{1-22}/DSF_{22}$, $A_{1-21}/Cd_{1-24}/DSF_{22-24}$, $A_{1-21}/Cd_{1-31}/DSF_{22-31}$ i $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$). Animalni model je dizajniran da imitira alkoholičar-pušače na terapiji DSF, kada se prestaje sa unosom alkohola ali se nastavlja sa pušenjem. Prestanak unosa etanola tokom terapije se podrazumeva, kako bi se izbegla neželjena DSF-alkohol reakcija. Tokom izvođenja eksperimenta, svakodnevno je praćena promena telesne mase životinja i unos hrane i vode.

U okviru ovog poglavlja opisana je metoda za histopatološku analizu tkiva jetre; metode za određivanje aktivnosti enzima funkcije jetre u plazmi (ALT i AST); plamena i hidridna atomska apsorpciona spektrometrija za merenje metala Cd, bakra (Cu), gvožđa (Fe), cinka (Zn), magnezijuma (Mg), odnosno selena (Se); i spektrofotometrijske metode za merenje parametara OS: malondialdehid (MDA), superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD), aktivnost katalaze (CAT), aktivnost glutathion reduktaze (GR), aktivnost glutathion peroksidaze (GPx) i aktivnost glutathion-S-transferaze (GST). Iz fiziološkog medijuma određivani su redukovani glutathion (GSH) i oksidirani glutathion (GSSG) te je utvrđen njihov odnos GSSG/GSH.

U odeljku Statistička obrada podataka je navedeno da se koristila jednofaktorska analiza varijanse (one-way ANOVA) i post-hoc Tukey-jev test (softver SPSS Statistics 24.0) za obradu dobijenih podataka, a nivo statističke značajnosti je bio $p < 0,05$.

U poglavlju **Rezultati** detaljno je opisana novo-uvodena izokratska HPLC-UV metode za paralelno određivanje GSH i GSSG u animalnim tkivima, a potom su predstavljeni rezultati o uticaju ispitivanih agenasa u zavisnosti od dužine (subakutna i subhronična) i načina (individualna i paralelna) izloženosti na: prirast telesne mase, funkcionalni status jetre (aktivnost ALT i AST u plazmi), koncentraciju esencijalnih metala i toksičnog Cd u jetri, kao i na koncentraciju biomarkera OS (MDA , $O_2^{\cdot-}$, GSH i GSSG) i aktivnost antioksidativnih enzima (SOD; CAT; GPx, GR i GST) u jetri. Histopatološka analiza tkiva jetre je takođe prikazana.

U ukupnom skoruu urađeno je 4968 analiza.

U poglavlju **Diskusija**, kandidat je dobijene rezultate detaljno poredio sa odgovarajućim rezultatima drugih autora. Rezultati uporedne analize upućivali su na objašnjenja mogućih mehanizama dejstva i tipa interakcija nakon izloženosti ispitivanim agensima, sa aspekta red-oks homeostaze, fokusirajući se na GSH-ciklus; statusa bioelemenata, kao i funkcionalnog statusa jetre.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (123) citiranih vankuverskim stilom.

U poslednjem poglavlju **Prilozi** prikazano je 17 tabela (Prilog 1 – 1 tabela; Prilog 2 - 6 tabela; Prilog 3 - 9; i Prilog 4 – 1) koje se odnose na dodatne rezultate ove doktorske disertacije.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Sprovedena studija je doprinela utvrđivanju zajedničkih mehanizama toksičnih efekata Cd i etanola kao i potencijalno zaštitnu ulogu DSF u ispoljavanju strukturnih i biohemijskih promena jetre. Potvrđeni su toksični efekti individualne i paralelene ekspozicije Cd i etanola, te i protektivna uloga DSF u kombinovanom tretmanu u vidu korekcije narušenog redoks statusa i statusa bioelemenata u jetri pacova prethodno izloženih Cd i/ili etanolu. Posebno je značajno rasvetljavanje interferencije sulfhidrilne (–SH) grupe metabolita DSF sa antioksidativnim odgovorom glutationskog ciklusa, kao i statusom metala u jetri u datim eksperimentalnim uslovima, te saglasno postavljenoj hipotezi, dobijeni rezultati potvrdili su interferenciju –SH grupe metabolita DSF sa glutationskim odgovorom na OS izazvan ispitivanim agensima u jetri pacova, u čemu se ogleda i doprinos u oblasti izučavanja štetnih efekata slobodnih radikala i antioksidativne zaštite. Rezultati su pokazali da je DSF odgovoran za očuvanje homeostaze glutaciona i potvrđuju značajan potencijal zaštitnih efekata DSF u pojedinačnom ili zajedničkom toksičnom delovanju alkohola i/ili Cd.

U pogledu uticaja na parametre koji ukazuju na funkciju jetre, primena pojedinačnih agenasa dovela je do povećanja aktivnosti ALT i AST u slučaju ekspozicije Cd, odnosno povećanja aktivnosti ALT u slučaju ekpozicije etanolu, dok je koekspozicija potvrdila da se oslobađanje AST u cirkulaciju dešava isključivo usljed ekspozicije Cd, te da efekat na ALT nije zbirni. Disulfiram *per se* nije doveo do promjene aktivnosti aminotransferaza, dok u

kombinovanim tretmanima dovodi do smanjenja aktivnosti ALT, iako nisu postignute kontrolne vrijednosti.

Analiza uticaja DSF *per se* i u kombinovanim tretmanima na koncentracije bioelemenata u jetri pokazala je povećanje koncentracije Cu, Fe, Zn i Se nakon individualne ekspozicije DSF, umjereno povećanje koncentracije Se i Fe u kombinovanom tretmanu A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ u poređenju sa ekspozicijom etanolu, aditivni efekat u povećanju koncentracije Fe i Zn, te umjereno povećanje koncentracije Cu i Se u kombinovanom tretmanu Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ u poređenju sa ekspozicijom Cd, i aditivni efekat u povećanju koncentracije Cu i Fe, te potencirajući efekat na koncentraciju Zn u kombinovanom tretmanu A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ u poređenju sa individualnom ekspozicijom Cd ili etanolu. Potvrđeno je da je depozicija Cd u jetri vremenski ovisna (Cd₁₋₂₁: 92%; Cd₁₋₃₁: 122%; Cd₁₋₄₂: 198% iznad vrijednosti Cd₁ grupe). Sadržaj Mg nije značajno izmijenjen tokom odabranih tretmana što upućuje na rezistentnost hepatičnog metabolizma Mg u odnosu na sprovedenu eksperimentalnu proceduru.

Parametri OS mereni su u cilju procene oksidativnog oštećenja jetre, utvrđivanja zajedničkih mehanizama toksičnosti Cd i etanola, sa fokusom na uključenost glutationskog ciklusa, te interferencije –SH metabolita DSF sa glutationskim odgovorom na OS indukovanoj ekspozicijom Cd i/ili etanolu. Primena Cd dovela je do smanjenja aktivnosti tSOD praćeno porastom sadržaja O₂^{•-}, smanjenje aktivnosti CAT, GST i GR, te porast sadržaja MDA. Usljed ekspozicije etanolu zabilježeno je takođe smanjenje aktivnosti tSOD praćeno porastom sadržaja O₂^{•-}, smanjenje aktivnosti CAT, te porast sadržaja MDA, dok je prisutno povećanje aktivnosti GST i nepromijenjen status aktivnosti GR. Redukcija tSOD aktivnosti usljed koekspozicije Cd i etanola je u nivou individualne ekspozicije, a zabilježeni porast sadržaja O₂^{•-} i MDA je značajno veći u odnosu na porast nakon ekspozicije Cd, dok se ne razlikuje značajno od porasta zabilježenog nakon ekspozicije etanolu.

Iako je zabilježen prooksidativni efekat DSF u vidu povećanja sadržaja O₂^{•-}, u kombinovanim tretmanima je primećeno značajno smanjenje sadržaja O₂^{•-} i MDA, iako nisu postignute kontrolne vrijednosti.

Aktivno učešće glutationskog ciklusa potvrđeno je povišenim GSSG/GSH odnosom nakon ekspozicije Cd, odnosno zabilježeno je iscrpljivanje zaliha GSH u jetri i snižena aktivnost GST. Pri odabranoj dozi i vremenu ekspozicije etanolu nije narušen GSSG/GSH odnos. Promene u GSSG/GSH odnosu odgovaraju promenama odnosa redoks para DSF/DDC, odnosno dati

odnos je u nivou kontrolne vrijednosti po završetku tretmana, što ukazuje na očuvanje homeostaze glutaciona. Uvođenje DSF u kombinovane tretmane Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ rezultiralo je delimičnim očuvanjem rezervi GSH, odnosno nižim odnosom GSSG/GSH.

Rezultati istraživanja pokazuju i značaj prilagođavanja metode direktnog i simultanog određivanja GSH i GSSG, čime se znatno preciznije procenjuje redoks potencijal promena, a što je od posebne važnosti za procenu učešća glutationskog ciklusa u nastanku OS kao važnog mehanizma toksičnosti ksenobiotika i brojnih bolesti. Primenjena HPLC-UV metoda za procjenu učešća glutationskog ciklusa u nastanku OS je optimizirana i predstavlja doprinos rutinskoj analizi bioloških uzoraka (Begić i sar. doi. 10.1556/1326.2017.29.1.5).

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje efekta DSF, u pogledu analize parametara OS i uključenosti glutationskog ciklusa, te statusa bioelemenata, u kombinovanom tretmanu sa Cd, te Cd i etanolom *in vivo*, dok su ranije samo istraživani efekti kombinovani efekti tretmana Cd i etanol (Nation i sar., 1994; Radosavljević i sar., 2012).

Saglasno literaturnim podacima o uticaju Cd, etanola i DSF na jetru (Adikwu i sar., 2013; Arroyo i sar., 2012; ATSDR, 2012; Bjornsson i sar., 2006; Das i Vasudevan, 2005), rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na smanjenje nivoa aktivnosti enzima ALT u kombinovanim tretmanima DSF sa Cd i/ili etanolom u poređenju sa individualnom ekspozicijom ispitivanim agensima, i time jasan hepatoprotektivan potencijal DSF. Sprovedenom histopatološkom analizom jetre potvrđen je oporavak jetre određenog stepena, i naročito se ističe efekat smanjenja infiltracije neutrofila u kombinovanom tretmanu Cd i DSF u poređenju sa individualnom ekspozicijom Cd (Adikwu i sar., 2013).

Rezultati disertacije nedvosmisleno potvrđuju da Cd indukuje OS, kroz izazvanu Fentonovu reakciju usled povećanja koncentracije slobodnih Cu i Fe jona (Thirumoorthy i sar., 2011; Maret i Wedd, 2014) i narušavanje funkcije neenzimskih i enzimskih antioksidanata (Arroyo, 2012). Retencija Cd u hepatocitima od samog početka tretmana takođe je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (Liu i sar., 2009). U nastanku OS aktivno učešće glutationskog ciklusa potvrđeno je povišenim GSSG/GSH odnosom, usled iscrpljivanja zaliha

GSH u jetri, što je u skladu sa literaturnim podacima (Checconi i sar., 2013). Smanjenje aktivnosti GST (Arroyo i sar., 2012) potvrđeno i ovom studijom, upućuje na to da se iscrpljivanje zaliha GSH ne dešava na račun reakcija tiolizacije, nego oksidacije u disulfidnu formu i formiranja Cd-GS₂ kompleksa. Odsustvo uticaja ekspozicije etanolu na koncentraciju Cu i Zn ukazuje da pri administriranoj dozi i vremenu ekspozicije nisu narušeni homeostatski mehanizmi kontrole ovih bioelemenata. Pokazano je da tek hronična i prekomerna ekspozicija etanolu dovodi do malabsorbicije i gubitka mnogih esencijalnih substanci putem urina (Gonzalez-Reimers i sar., 1998). Porast sadržaja Fe i promocija OS su u skladu sa literaturnim podacima (Shaw i Jayatilleke, 1990). Efekti etanola na nivo GSH u jetri su oprečni u raznim studijama i variraju od smanjenja, porasta, do neizmenjenog sadržaja GSH (Dey i Cederbaum, 2006; Cederbaum, 1989). Sprovedena studija je pokazala da GSSG/GSH odnos nije narušen pri odabranoj administriranoj dozi i vremenu ekspozicije.

Ekspozicija DSF je dovela do povećanja koncentracije bioelemenata (Cu, Zn, Fe i Se) što je u skladu sa literaturnim podacima (Iljin i sar., 2009; Giles i sar., 2003). Proksidativni efekat DSF izražen je prekomernom produkcijom O₂^{•-} koja potiče iz više izvora (Stohs i sar., 2000; Spiazzi i sar., 2013). Antioksidativni efekat se ogleda u očuvanju homeostaze glutaciona, odnosno promene u GSSG/GSH odnosu odgovaraju promenama odnosa redoks para DSF/DDC (Liu i sar., 2008), što je i potvrda veze metabolita DSF sa glutationskim odgovorom.

Uvođenje DSF u tretman dovelo je do smanjenja produkcije O₂^{•-} i manjeg stepena LPO u svim kombinovanim tretmanima, u kojima je kroz delimično očuvanje homeostaze glutaciona potvrđena antioksidativna uloga DSF. Zabeleženi niži odnos GSSG/GSH, u poređenju sa dokazanim pražnjenjem zaliha GSH usled ekspozicije Cd, ukazuje na to da preovladava formiranje Cd-DDC u odnosu na Cd-GS₂ kompleks. Formirani Cd-DDC kompleks brzo podleže razgradnji in vivo, stoga i pruža delimično protektivni efekat.

Metode dostupne za analitiku obe forme glutaciona tehnikom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) uglavnom podrazumevaju zahtevnu proceduru pripreme bioloških uzoraka uključujući postupak derivatizacije, pri čemu se često dešava oksidacija GSH i lažno povišene izmerene vrednosti GSSG-a (Giustarini i sar., 2003). Optimizacija HPLC-UV metode za simultano određivanje obe forme glutaciona, kako u delu pripreme i čuvanja uzorka za analizu, tako i hromatografskih uslova, je deo sprovedene studije, koja je omogućila jednostavnu pripremu bioloških uzoraka bez derivatizacije, što sve zajedno predstavlja značajan doprinos

rutinskoj analizi bioloških uzoraka u procjeni učešća glutationskog ciklusa u nastanku OS kao važnog mehanizma toksičnosti mnogih ksenobiotika, a i patoloških stanja (Begić i sar., 2017).

Literatura

Adikwu E, Deo O, Geoffrey OBP. Hepatotoxicity of Cadmium and Roles of Mitigating Agents. *Br J Pharmacol Toxicol*. 2013; 4:222-231.

Arroyo VS, Flores KM, Ortiz LB, Gomez-Quiroz LE, Gutierrez-Ruiz MC. Liver and Cadmium Toxicity. *J Drug Metab Toxicol*. 2012; S5

ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2012.

Bjornsson E, Nordlinder H, Olsson R. Clinical characteristics and prognostic markers in disulfiram-induced liver injury. *J Hepatol*. 2006; 44(4):791-7.

Cederbaum AI. Introduction: Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Radic Biol Med*. 1989; 7:537-539.

Checconi P, Squarabanti R, Celestino I, Limonqi D, Amatore D, Iuvara A, Alimonti A, Garaci E, Palamara AT, Nencioni L. The Environmental Pollutant Cadmium Promotes Influenza Virus Replication in MDCK Cells by Altering Their Redox State. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(2):4148-4162.

Das SK, Vasudevan DM. Effect of ethanol on liver antioxidant defense systems: a dose dependent study. *Ind J Clin Biochem*. 2005; 20(1):80-84.

Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. 2006; 43(2):S63-74.

Giles NM, Watts AB, Giles GI, Fry FH, Littlechild JA, Jacob C. Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function. *Chem Biol*. 2003; 10:677-693.

Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35:1365-72.

Gonzalez-Reimers E, Martinez-Riera A, Santolaria-Fernandez F, Mas-Puscual A, Rodriguez-Moreno F, Galindo-Martin L, Molina-Perez M, Barros-Lopez N. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and fecal excretion. *Alcohol*. 1998; 16:7-12.

Iljin K, Ketola K, Vainio P, Halonen P, Kohonen P, Fey V, Grafström RC, Perälä M, Kallioniemi O. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(19):6070-8.

Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxic Appl Pharmacol.* 2009; 238:209-214.

Maret W, Wedd A. Binding, transport and storage of metal ions in biological cells. *RSC Metallobiology.* 2014.

Nation JR, Burkey RT, Grover CA, Bratton GR. The effects of cadmium exposure on ethanol pharmacokinetics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 48(2):543-6

Shaw S, Jayatilleke E. Ethanol-induced iron mobilization: role of acetaldehyde-aldehyde oxidase generated superoxide. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9:11-17.

Radosavljević T, Mladenović D, Ninković M, Vučević D, Boričić I, Ješić-Vukićević R, Šljivančanin T, Lopičić S, Todorović V. Oxidative stress in rat liver during acute cadmium and ethanol intoxication. *J Serb Chem Soc.* 2012; 77(2):159–176.

Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol.* 2011; 9:54.

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Brojni ksenobiotici, terapeutici i sredstva koja izazivaju zavisnost uzrokuju oštećenje jetre. Toksikologija kombinovane ekspozicije posljednjih godina dobija sve više na značaju, budući da je višekomponentna ekspozicija zapravo realan scenario u životnoj sredini. Stoga i potreba da se sveukupno sagledaju efekti, mogući zajednički mehanizmi toksičnosti, odnosno moguće interakcije nastale izloženošću većem broju toksičnih supstanci. S obzirom da je navika pušenja često udružena sa zloupotrebom alkohola, i imajući u vidu da su pušači izloženi toksičnom metalu, kadmijumu (Cd), putem duhana, postavljena animalna studija je imala za cilj da imitira uslove ekspozicije kod alkoholičara-pušača kod kojih se sprovodi averzivni tretman lečenja alkoholizma.

Do sada su ispitivani efekti individualne ekspozicije Cd, etanolu i DSF, dok rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalni naučni doprinos o subhroničnim toksičnim

efektima kombinovanih tretmana etanola i DSF, Cd i DSF, i u konačnici etanola, Cd i DSF. Data studija obuhvata širok spektar ispitivanih parametara, uključujući analitiku enzima funkcionalnog statusa jetre, status bioelemenata, te opsežno izučavanje oksidativnog stresa, sa fokusom na uključenost glutationskog ciklusa kao antioksidativnog odgovora na OS indukovani Cd i/ili etanolom.

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju sigurnu primenu DSF kod lečenja alkoholizma. Potvrđeni su mehanizmi toksičnosti ispitivanih agenasa, odnosno da je zajednički mehanizam toksičnosti indukovani OS. Uvođenje DSF u tretman dovodi do smanjenja ROS i LPO do određenog stepena. Kombinovani tretmani su takođe potvrdili interakcije –SH grupe metabolita DSF (DDC) sa glutationom i nastanak Cd-DDC kompleksa koji u određenoj meri omogućava oporavak jetre, odnosno očuvanje zaliha GSH u jetri, dok efekat etanola na homeostazu glutaciona pri odabranoj dozi i vremenu ekspozicije nije zabeležen.

Studija predstavlja naučni doprinos i u domenu analitike glutationskog statusa u jetri. Optimizirana HPLC-UV metoda je pogodna za rutinsku analizu bioloških uzoraka, odnosno omogućena je jednostavna priprema bioloških uzoraka i očuvanje oksidirane forme glutaciona.

Sumarno, sprovedena studija potvrđuje protektivni efekat DSF u uslovima kombinovane ekspozicije Cd i/ili etanolu pri subhroničnoj ekspoziciji. Rezultati afirmativno upućuju na potrebu za daljim kliničkim istraživanjima kod pušača alkoholičara na terapiji DSF i ispitivanju potencijala –SH grupe metabolita DSF u korigovanju narušenog redoks statusa kod njih. Ne manje važno jeste da ova studija otvara put ispitivanja helatnih i antidoskih efekata DSF kod trovanja teškim metalima, s obzirom da se za sada DSF kao terapeutik koristi samo u averzivnoj terapiji alkoholizma.

E. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rad u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20):

Prvi je autor u 2/3 rada u kategoriji (M21 i M23)

1. **Aida Begić**, Ana Djuric, Milica Ninkovic, Ivana Stevanovic, Dragan Djurdjevic, Milos Pavlovic, Katarina Jelic, Ana Pantelic, Goran Zebic, Luciano Saso, Bratislav Dejanovic, Ivan

- Stanojevic, Danilo Vojvodic, Mirjana Djukic. Disulfiram moderately restores impaired hepatic redox status of rats subchronically exposed to cadmium. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017:32(1):478–489 (IF 3,428): (M21)
2. Ana Djuric, **Aida Begic**, Borko Gobeljic, Milica Ninkovic, Ivan Stanojevic, Danilo Vojvodic, Ana Pantelic, Goran Zebic, Vera Prokic, Bratislav Dejanovic, Ivana Stojanovic, Marina Pavlica, Dusan Djukic, Luciano Saso, Dragan Djurdjevic, Milos Pavlovic, Aleksandra Topic, Dragana Vujanovic, Ivana Stevanovic, Mirjana Djukic. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 86:25–33. (IF 3,584) (M21)
 3. **Aida Begic**, Ana Djuric, Borko Gobeljic, Ivana Stevanovic, Vera Lukic, Ivan Stanojevic, Milica Ninkovic, Luciano Saso, Danilo Vojvodic, Mirjana Djukic. The simple isocratic HPLC – UV method for the simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in animal tissue. *Acta chromatographica (Poland)* 2015; in press, manuscript No.1/2017(1). DOI: 10.1556/1326.2017.29.1.5. (IF 0.550) (M23)

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34):

Prvi je autor u 6/13 saopštenja, kategorije M34

1. **Aida Begic**, Mirjana Djukic. Disulfiram affects liver bioelements and functional status in rats. Treći simpozij magistara farmacije Tuzlanskog kantona: POMICANJE GRANICA I NOVI IZAZOVI U FARMACIJI. Tuzla, 26 - 27.03.2016. Zbornik radova: 2016: pp.7-8; ISSN: 2303-7229.
2. **Aida Begic**, Mirjana Djukic. Pro- and anti- oxidant features of disulfiram in rat liver. Treći simpozij magistara farmacije Tuzlanskog kantona: POMICANJE GRANICA I NOVI IZAZOVI U FARMACIJI. Tuzla, 26 - 27.03.2016. Zbornik radova: 2016 pp.5-6; ISSN: 2303-7229.
3. A. Djuric, M. Djukic, **A. Begic**, A. Pantelic, G. Zebic, I. Stevanovic, M. Ninkovic, I. Stanojevic, D. Vojvodic. Impaired bioelements status retrieval with disulfiram in testes of rats subchronically exposed to cadmium. Drugi simpozij magistara farmacije Tuzlanskog

- kantona: «Farmaceut stručnjak u različitim oblastima», Tuzla, 21.03. - 22.03.2015. Zbornik radova 2015; 2: 59-61.
4. **A. Begić**, M. Djukic, A. Djuric, I. Stevanovic, M. Ninkovic, I. Stanojevic, D. Vojvodic. Disulfiram in co-administration with cadmium reduces oxidative stress in liver of exposed rats. Drugi simpozij magistara farmacije Tuzlanskog kantona: «Farmaceut stručnjak u različitim oblastima», Tuzla, 21.03. - 22.03.2015. Zbornik radova 2015; 2: 57-58.
 5. M. Đukić, I. Stevanovic, M. Ninkovic, D Vojvodic, A. Djuric, **A. Begić**, B. Gobeljic, I. Stanojevic, L. Todorovic, B. Stanojevic. Subchronic zeolite intake alters essential metals and red-ox status in the exposed rats. The 3rd Congress of Pharmacists of Bosnia & Herzegovina with international participation – Sarajevo, May, 14-17, 2015. Pharmacia 2015. 18(1): 169.
 6. A. Djuric, M. Djukic, **A. Begić**, I. Stevanovic, M. Ninkovic, I. Stanojevic, D. Vojvodic. Effect of disulfiram on lipid peroxidation and testosterone production in testes of rat subchronically exposed to cadmium. The 3rd Congress of Pharmacists of Bosnia & Herzegovina with international participation – Sarajevo, May, 14-17, 2015. Pharmacia 2015. 18(1): 163-164.
 7. **A. Begić**, M. Đukić, A. Đurić, I. Stevanović, M. Ninković, I. Stanojević, D. Vojvodić. Effect of disulfiram on oxidative stress in the rat liver subchronically exposed to ethanol and cadmium. The 3rd Congress of Pharmacists of Bosnia & Herzegovina with international participation – Sarajevo, May, 14-17, 2015. Pharmacia 2015. 18(1): 170.
 8. A. Djuric, M. Djukic, **A. Begić**, D. Djukic-Cosic, A. Pantelic, G. Zebic, I. Stevanovic, M. Ninkovic. Cadmium Induces Oxidative Stress in the Rat Testes. 11th Serbian Congress of Toxicology “New Frontiers and Challenges in Toxicology”, Sremski Karlovci, 24-27. 06. 2014.
 9. A. Djuric, M. Djukic, **A. Begić**, D. Djukic-Cosic, A. Pantelic, G. Zebic, I. Stevanovic, M. Ninkovic. Oxidative Status in Testes of Rats Subchronically Exposed to Ethanol and Cadmium. 11th Serbian Congress of Toxicology “New Frontiers and Challenges in Toxicology”, Sremski Karlovci, 24-27. 06. 2014.
 10. **A. Begić**, M. Djukic, A. Djuric, V. Lukic. HPLC-UV/VIS Method for Determination of Reduced and Oxidized Glutathione. 11th Serbian Congress of Toxicology “New Frontiers and Challenges in Toxicology”, Sremski Karlovci, 24-27. 06. 2014.

11. Ana Djuric, Mirjana Djukic, **Aida Begic**, Danijela Djukic-Cosic, Ivana Stevanovic, Milica Ninkovic. Disulfiram Reduces Lipid Peroxidation in Testes of Rat Subchronically Exposed to Ethanol and Cadmium. 14th ISANH Congress on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants. June 12-13, 2014- Paris- France.
12. **Begic**, M Djukic, A Djuric , I. Stevanovic, M. Ninkovic. Partially hepatoprotective effect of disulfiram against oxidative stress in rats exposed to cadmium. 6. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 15 - 19. oktobar 2014. Abstract book: 435-436
13. A. Djuric, M. Djukic, **A. Begic**, D. Djukic-Cosic, A. Pantelic, G. Zebic, I. Stevanovic, M. Ninkovic. Changed status of bioelements in testes of rats subchronically exposed to cadmium. 6. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 15 - 19. oktobar 2014. Beograd. Abstract book: 444-445.

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Pregledom završene doktorske disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Na osnovu izloženog, može se zaključiti da rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti ispitivanja toksičnosti smeša.

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu mr pharm Aidi Begić javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Interferencija tiolnih grupa metabolita disulfirama sa glutationskim odgovorom na oksidativni stres indukovano kadmijumom i/ili alkoholom u jetri pacova“

Dr sc. Mirjana Đukić (mentor i predsednik Komisije), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Milica Ninković (mentor), vanredni profesor, Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Dr sc. Dragana Vujanović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danijela Đukić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Milena Simić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet