

**НАСТАВНО –НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Лене Платанић Аризановић, мастер биохемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној дана 10.11.2021. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Лене Платанић Аризановић, мастер биохемичара, докторанда Хемијског факултета, под насловом:

"Молекулске основе деловања атипичних антипсихотика клозапина, сертиндола и зипразидона на јетру пацова и еритроците човека"

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 27.01.2022. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број 61206-3541/6-21).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација **Лене Платанић Аризановић** написана је на 64 стране А4 формата (фонт *Times New Roman*; величина слова 12 pt; проред 1; маргине 2 cm) и садржи 28 слика и 6 табела. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (2 стране), Теоријски део (19 страна), Експериментални део (12 страна), Резултати и дискусија (20 страна), Закључак (2 стране) и Литература (8 страна, 146 цитата). Насловне стране дисертације су на српском и енглеском језику, као и њен сажетак (по 1 страна). Поред наведеног, дисертација садржи и страну са именима чланова Комисије, Захвалницу (1 страна), Садржај (2 стране), Биографију кандидаткиње са списком објављених радова проистеклих из дисертације (1 страна), Изјаве о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (по 1 страна) и коришћењу (2 стране).

УВОД садржи концизно представљени предмет истраживања дисертације, са освртом на актуелност изабране проблематике у научној литератури, затим општи циљ дисертације (испитивање учинка три атипична антипсихотика на јетру пацова и еритроците човека), три задатка кроз које је он конкретизован (видети даље), коришћени полазни материјал за рад, као и општи значај добијених резултата.

ТЕОРИЈСКИ ДЕО састоји се од четири целине. Полазећи од циља и дефинисаних задатака дисертације, у овом поглављу су укратко приказани: структура и својства, биохемијске и фармаколошке основе деловања клозапина, сертиндола и зипразидона (прва целина); функционалне карактеристике јетре (друга целина) и еритроцита (трећа целина), са посебним освртом на њихове компоненте (ензиме антиоксидативне заштите, плазмину мембрану еритроцита, молекул хемоглобина) које су биле основни модел-системи за испитивање утицаја одабраних лекова на њихову структуру и/или активност; аналитичке

основе и могућности метода које се рутински користе у биохемији протеина за праћење везивања малих молекула (лекова) за протеине од интереса (последња, четврта целина).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО садржи опис коришћеног полазног материјала, једињења и реагенаса, метода и протоколе коришћене у експерименталном (и *in-silico*) раду током израде дисертације поднете на оцену.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА су организовани у три целине, према задацима постављеним пред кандидаткињу. У првој су приказани резултати утицаја хроничног третмана пацова клозапином, сертиндолом и зипразидоном (*in vivo* студија) на ензимске компоненте заштитног антиоксидативног система, као и уочени налази пратећих оштећења ткива јетре. У другој су дати резултати испитивања и карактерисања везивања наведених лекова за молекул хемоглобина човека (*in vitro* студија), уз приказ података добијених праћењем утицаја њиховог везивања на елементе структуре и стабилности протеина. У трећој целини су представљени резултати учинка три атипична антипсихотика на флуидност мембране хуманих еритроцита и интегритет ових ћелија крви у оксидативном окружењу (*ex vivo* студија). У свакој целини је приказ добијених резултата праћен њиховом дискусијом и упоредном анализом са научном литературом која проучава сличну проблематику.

ЗАКЉУЧАК сумира најважније остварене резултате из докторске дисертације и одговара на задатке дефинисане из општег циља рада, представљеног у Уводу.

ЛИТЕРАТУРА обухвата научне радове и књиге са информацијама из области истраживања дисертације, поређане према абецедном редоследу првог слова презимена првог аутора.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У првом делу ове дисертације најпре је испитано да ли атипични антипсихотици клозапин, сертиндол или зипразидон утичу на ензимски систем антиоксидативне заштите у јетри. Експресија и активност супероксид-дисмутазе (SOD, енгл. superoxide dismutase) тип 1 (Cu,Zn-) и тип 2 (Mn-), каталазе (CAT, енгл. catalase), глутатион-пероксидазе (GPx, енгл. glutathione peroxidase), глутатион-редуктазе (GR, енгл. glutathion reductase) и глутатион-S-трансферазе (GST, енгл. glutathion S-transferase) измерене су у јетри пацова (спектрофотометријске методе), након 28 дана третмана лековима (суспензије таблета са активном супстанцом лека) у дозама које одговарају хуманој антипсихотичној терапији. Клозапин је повећао активност SOD (оба типа), GR и GST, а смањио активност CAT, док је третман сертиндолом повећао активност SOD 1 и 2, у поређењу са контролном групом животиња. У групи пацова третираних зипразидоном пронађено је само смањење CAT активности. Сва три антипсихотика су изазвала благе до умерене хистопатолошке промене, окарактерисане као регенеративне промене јетре (промене облика ћелија, промене облика једра у ћелијама, ћелије са два једра), уз увећање Купферових ћелија. Нису примећени очигледни знаци инфилтрације ћелија имунског система, микро- или макро-везикуларне масне промене, као ни хепатоцити у митози. Према томе, хроничан третман атипичним антипсихотичима променио је активност заштитног антиоксидантног ензимског система и изазвао хистопатолошке промене у јетри пацова, пре свега код животиња којима је даван клозапин. Ови резултати сугеришу да поремећаји редокс-хомеостазе могу да допринесу дисфункцији јетре уоченој код пацијената на дуготрајној терапији атипичним антипсихотичима.

У другом делу дисертације прво је испитано и окарактерисано везивање клозапина, зипразидона и сертиндола за хумани хемоглобин, у симулираним физиолошким условима (изотони пуфер, рН 7,2), стандардним спектроскопским методама (флуориметрија, циркуларни дихроизам, апсорпциона спектрофотометрија у видљивој области). Анализа гашења (квенчинга) унутрашње флуоресценције хемоглобина (главна хромофора су остаци $\beta 37$ -Trp) на различитим температурама и подаци добијени из van't Hoff-овог дијаграма и *in-silico* методе молекулског докинга, показали су статички тип квенчинга, да тетрамерни хемоглобин има једно везивно место за сва три испитана неполарна психофармака, у централној шупљини близу $\alpha\beta$ интерфејса, као и да је настајање хемоглобин-антипсихотик комплекса пре свега посредовано хидрофобним силама. Израчунате константе везивања лигананда за протеин биле су умерене јачине ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$), највеће за клозапин ($2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ на 25°C). Везивање клозапина показало је све повољне ефекте на молекул хемоглобина: повећан садржај α -хеликса, виша тачка топљења и заштита протеина од оксидације посредоване слободним радикалима у односу на чист протеин. Са друге стране, везани зипразидон и (нешто мање) сертиндол су имали благо про-оксидативно дејство, повећавајући садржај оксидованог мет-хемоглобина, облика овог транспортног протеина који реверзибилно не везује кисеоник. Резултати експеримената инкубирања еритроцита са антипсихотицима, у концентрацијама које су показале ефекат на хемоглобин, иду у прилог томе да нити један од антипсихотика нема значајнији ефекат на флуидност плазмине мембране (ЕПР студија са спинским пробама), те да сва три лека штите интегритет еритроцита у (оксидативном) окружењу које фаворизује његову хемолизу, а пре свега клозапин. Будући да на везивање лекова за протеине утичу њихова фармакокинетичка и фармакодинамичка својства, описани резултати указују на могући значај молекула хемоглобина у овим процесима *in vivo*.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Не постоји лек који нема нежељена дејства на организам човека у препорученој дози, већ само лекови који их ређе или чешће испољавају. Антипсихотици, као лекови избора у третману шизофреније, пре свега делују као антагонисти допаминских рецептора ("типично" деловање), иако се многи везују и за друге рецепторске системе ("атипично" деловање), чиме се објашњава не само њихова изузетна клиничка ефикасност, већ и бројни споредни ефекти. Већина атипичних (новијих) антипсихотика показује и неповољне метаболичке ефекте. Оксидативни стрес се сматра важним механизмом који у јетри (и телу уопште) води развоју и прогресији патофизиолошких промена које су последица деловања антипсихотика и/или њихових метаболита [1].

Хронични третман пацова са сва три тестирана атипична антипсихотика (клозапин, сертиндол и зипразидон) значајно је смањио САТ активност у јетри животиња. У литератури је већ забележено смањење не само активности, већ и концентрације САТ после третмана пацова (атипичним) антипсихотицима [2]. Поремећаји у функцији ензимског анти-оксидативног система били су најизраженији као одговор хепатоцита на клозапин, где повећана акумулација водоник-пероксида (H_2O_2) изгледа није само била последица смањене активности каталазе (чији је пероксид супстрат), већ и снажног повећања активност оба типа SOD, као резултат повећаног настајања њиховог супстрата, супероксид-анјон радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Познато је да током метаболизма клозапина у јетри настају реактивне врсте које потичу од молекулског кисеоника, пре свега управо $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [3]. Према резултатима из ове дисертације, клозапин је утицао и на GSH (редуковани глутатион) циклус у јетри пацова,

повећавајући не само активност GPx (детоксикује пероксиде), већ и концентрацију GR (обнавља ниво GSH) и активност GST (користи GSH за детоксификацију производа прве фазе метаболизма лекова), што све може бити адаптивни одговор ћелија на повећано настајање и нагомилавање H₂O₂. У сличном *in vivo* модел систему [4], такође је утврђено значајно повећање GST активности, уз смањени садржај редукованог глутатиона у јетри пацова третираних клозапином (притом и хронично изолованим), у поређењу са контролном групом животиња. Нежељени метаболички ефекти у липидном профилу плазме и поремећаји активности антиоксидативних ензима у еритроцитима пацијената који су хронично (више година) лечени клозапином такође су делимично приписани оксидативном стресу и поремећају редокс хомеостазе [5]. Резултати ове дисертације указују и на блаже до умерене хистопатолошке промене у ткиву јетре пацова као последица хроничног третмана атипичним антипсихотикима, пре свега у зипразидонској, али и клозапинској групи животиња, што је резултат и многих других студија. Осим оксидативног стреса, један од предложених механизма оштећења ткива јетре јесте везивање лекова и/или њихових метаболита за кључне регулаторне протеине, што због прекомерне активације имунског система може да доведе и до некрозе [6]. Међутим, третман нити једним од три антипсихотика у овој дисертацији није изазвао инфилтрацију имунских ћелија у јетру пацова, тј. њихов улазак у ткиво и просторе где се нормално не налазе. Ипак, број и величина Купферових ћелија, присутних у синусоидима јетре, били су израженији код животиња третираних клозапином и сертиндолом.

У оквиру ове дисертације по први пут је окарактерисано везивање клозапина, сертиндола и зипразидона за молекулу хуманог хемоглобина, као и неке последице образовања протеин–лек комплекса на структуру и својства овог есенцијалног хемопротеина. У литератури нема података нити за интеракције између других (највише у клиничкој пракси коришћених) антипсихотика и хемоглобина, као и да они утичу на флуидност плазмине мембране еритроцита и стабилност ових ћелија у про-оксидативном окружењу. У поређењу са другим биоактивним једињењима која се везују за најзаступљеније протеине крви (нпр. [7]), везивање анализираних антипсихотика за хемоглобин било је ниже-умерене јачине (константе асоцијације реда величине 10⁴ M⁻¹). Сва три атипична антипсихотика се према добијеним подацима везују у централну шупљину хемоглобинског тетрамера, што је место везивања и свих до сада испитаних ксенобиотика (нпр. [8]). Релативно снажна заштитна активност везаног клозапина, против оксидације (протеинског дела) хемоглобина и хемоллизе еритроцита, у складу је са утврђеном антиоксидативном активношћу лека у различитим модел системима (нпр. [9]). Слични заштитни ефекти везивања овог антипсихотика добијени су и за неке протеине плазме, на пример фибриноген [10].

Литература:

- [1] Lepping P, Delieu J, Mellor R, Williams JHN, Hudson PR, Hunter-Lavin C. Antipsychotic medication and oxidative cell stress: a systematic review. *J Clin Psychiatry*. 2011; 72(3):273-85. <https://doi.org/10.4088/JCP.09r05268yel>
- [2] Pillai A, Parikh V, Terry A, Mahadik SP. Long-term antipsychotic treatment and crossover studies in rats: Differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatric Res*. 2007; 41(5):372-86. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.01.011>

- [3] Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutation Res.* 2005; 569(1-2):101-110. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021>
- [4] Zlatković J, Todorović N, Tomanović N, Bošković M, Djordjević S, Lazarević-Pašti T, Bernardi RE, Đurđević A, Filipović D. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: A histopathological study. *Er J Pharmac Sci.* 2014; 59:20-30. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.010>
- [5] Miljević C, Nikolić M, Nikolić-Kokić A, Jones D, Niketić V, Lečić-Tosevski D, Spasić MB. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 34(2):303-7. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.024>
- [6] Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, Aithal GP. Drug-induced liver injury: Recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut* 2017; 66(6):1154-1164. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313369>
- [7] Nedić O, Penezić A, Minić S, Radomirović M, Nikolić M, Ćirković Veličković T, Gligorijević N. Food antioxidants and their interaction with human proteins. *Antioxidants* 2023; 12(4):815. <https://doi.org/10.3390/antiox12040815>
- [8] Dohare N, Siddiquee MA, Parray MD, Kumar A, Patel R. Esterase activity and interaction of human hemoglobin with diclofenac sodium: A spectroscopic and molecular docking study. *J Mol Recognit.* 2020; 33(8):e2841. <https://doi.org/10.1002/jmr.2841>
- [9] Caruso G, Grasso M, Fidilio A, Tascetta F, Drago F, Caraci F. Antioxidant properties of second-generation antipsychotics: Focus on microglia. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020; 13(12):457. <https://doi.org/10.3390/ph13120457>
- [10] Gligorijević N, Vasović T, Lević S, Miljević Č, Nedić O, Nikolić M. Atypical antipsychotic clozapine binds fibrinogen and affects fibrin formation. *Int J Biol Macromol.* 2020; 154:142-149. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.119>

Г. Објављени и саопштени радови који чине део дисертације

Резултати истраживања из ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада у часописима са SCI листе на којима је кандидаткиња први аутор. Један рад је објављен у часопису категорије M21, а други у часопису категорије M22. Део резултата је представљен и као саопштење на скупу националног значаја (M64).

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

Platanić Arizanović L, Gligorijević N, Cvijetić I, Mijatović A, Krstić Ristivojević M, Minić S, Nikolić Kokić A, Miljević Č, Nikolić M. Human Hemoglobin and Antipsychotics Clozapine, Ziprasidone and Sertindole: Friends or Foes? *Int J Mol Sci.* 2023; 24(10):8921. ISSN 1422-0067. (IF₂₀₂₂=5,6; Област: Biochemistry & Molecular Biology 66/285) <https://doi.org/10.3390/ijms24108921>

Рад у истакнутом међународном часопису (M22)

Platanić Arizanović L, Nikolić-Kokić A, Brkljačić J, Tatalović N, Miler M, Oreščanin-Dušić Z, Vidonja Uzelac T, Nikolić M, Milošević V, Blagojević D, Spasić S, Miljević Č. Effects of several atypical antipsychotics clozapine, sertindole or ziprasidone on hepatic antioxidant enzymes: Possible role in drug-induced liver dysfunction. *J Toxicol Environ Health A.* 2021; 84(4):173-182. (IF₂₀₂₀=2,527; Област: Public, Environmental & Occupational Health 144/296)

<https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1844827>

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

L. Platanić Arizanović, A. Nikolić-Kokić, I. Spasojević, S. Minić, Č. Miljević, M.R. Nikolić. Atypical antipsychotics clozapine, sertindole, ziprasidone, and erythrocytes: Friends or foes? Serbian Biochemical Society X Conference with international participation: "Biochemical Insights into Molecular Mechanisms". Kragujevac, September 24, 2021. Proceedings. Page 129.

http://www.bds.org.rs/download/SBS_Conference_10_2021.pdf

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена 21.08.2023. године, на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, број 204/22.06.2018). Помоћу програма iThenticate је утврђено да количина подударача текста (енгл. similarity index) износи 11%. Добијени степен подударности последица је цитата, личних имена и звања, библиографских података у коришћеној литератури, општих места и података, као и претходно објављених резултата истраживања докторанда, проистеклих из ове дисертације, све у складу чланом 9 наведеног Правилника.

На основу свега изнетог, а на основу члана 8 истог Правилника, Комисија је мишљења да резултати Извештаја о провери оригиналности докторске дисертације кандидаткиње Лене Платанић Аризановић поврђује њену оригиналност, као и да су у потпуности испоштована академска правила цитирања, те да прописани поступак припреме за њену одбрану може да се настави.

Ђ. Закључак

Комисија је на основу детаљног увида у текст докторске дисертације под насловом: **"Молекулске основе деловања атипичних антипсихотика клозапина, сертиндола и зипразидона на јетру пацова и еритроците човека"**, закључила да је докторанд Лена Платанић Аризановић успешно одговорила на све постављене задатке у оквиру своје дисертације. Они су се односили на разумевање утицаја наведених лекова на ткиво и ћелије јетре, као и на еритроците и њихову плазмину мембрану и молекул хемоглобина, све под (симулираним) физиолошким условима, а са циљем потпунијег познавања учинака клозапине, сертиндола и зипразидона на (у основи протеинске) структуре изван мозга у коме су жељена мета деловања ових психофармака.

У оквиру поднете докторске дисертације, постигнути резултати су објављени у два научна рада, на којима је кандидаткиња први аутор. Један је у врхунском међународном часопису (категорија M21), а други у истакнутом међународном часопису (категорија M22). Осим тога, кандидаткиња је представила део резултата из дисертације као саопштење на скупу националног значаја (категорија M64).

Комисија сматра да резултати кандидаткиње, представљени у приложеној докторској дисертацији, представљају значајан допринос у мултидисциплинарној области науке која испитује биохемијске ефекте лекова и могуће механизме њиховог деловања са протеинима као основним молекулским метама. Добијени резултати би осим фундаменталног биохемијског (допринос истраживањима интеракција различитих протеин–лек система), могли да имају и значај за разумевање сложених механизма штетних и/или корисних

(плејотропних) ефеката атипичних антипсихотика на ткива и ћелије, што би могло да утиче на разматрања њихове будуће (мање или веће) примене у клиничкој пракси.

На основу свега наведеног, а у складу са Законом о високом образовању и Статутом Универзитета у Београду – Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да поднету докторску дисертацију Лене Платанић Аризановић, под насловом: **"Молекулске основе деловања атипичних антипсихотика клоzapине, сертиндола и zipразидона на јетру пацова и еритроците човека"**, прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 28.08.2023. год.

Комисија:

др Милан Николић, ванредни професор (ментор)
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Чедо Миљевић, доцент и научни сарадник (ментор)
Универзитет у Београду – Медицински факултет и Институт за ментално здравље

др Александра Николић-Кокић, научни сарадник (члан)
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић",
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Марија Стојадиновић, доцент (члан)
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Илија Цвијетић, доцент (члан)
Универзитет у Београду – Хемијски факултет