

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. 05. 2016. године, прихваћен је Извештај ментора др Јанка Пејовића и др Милене Катарановски о урађеној докторској дисертацији магистра наука Весне С. Субота, Одсек за лабораторијску хематологију Института за медицинску биохемију, Војномедицинске академије у Београду, под насловом „**Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

др Јанко Пејовић, доцент, Медицински факултет Војно-медицинске академије, Универзитет одбране у Београду

др Милена Катарановски, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Драган Катарановски, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Саша Василијић, ванредни професор, Медицински факултет Војно-медицинске академије, Универзитет одбране у Београду

др Александра Попов Александров, научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Весне С. Суботе под насловом „**Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова**“ обухвата 123 странице текста, 38 слика и 12 табела. Текст се састоји од 7 поглавља и то: Увод (34 стране), Циљеви рада (3 стране), Материјал и методе (13 страна), Резултати (35 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (3 стране) и Литература (21 страна).

Предмет докторске дисертације је испитивање имуномодулаторних ефеката антикоагуланта варфарина након његове епикутане и оралне примене код пацова. Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у оквиру групе за имунотоксикологију Одељења за екологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, а процедуре рада са животињама су одобрене од стране Етичког комитета истог института (решење бр. 01-07/14).

Резултати истраживања које је кандидаткиња Весна С. Субота приказала у овој дисертацији пружају нова сазнања о имуномодулаторном потенцијалу антикоагуланта варфарина. Овај агенс инхибира циклус витамина К и на тај начин синтезу бројних фактора коагулације у јетри. Због овог ефекта варфарин је нашао примену као антикоагулантни родентицид и као терапеутско средство у профилакси тромбоемболијских болести. Захваљујући инхибицији циклуса витамина К, варфарин утиче и на протеине који учествују у физиолошким процесима ван хемостазе (развој

костију, раст глаткомишићних ћелија васкулатуре и мезангијских ћелија и други), што доводи до штетних последица. Варфарин инхибира и процесе који нису у вези са витамином К, укључујући раст тумора, а малобројни подаци указују да овај агенс може да делује и на поједине аспекте имунске функције. Међутим, механизми деловања варфарина на имунски систем су најмање испитани.

У својој дисертацији, кандидаткиња Весна Субота је испитала имуномодулаторни потенцијал варфарина након његове поновљене епикутане примене (што одговара професионалној или акциденталној изложености коже), као и након субкутане оралне изложености (у пијаћој води), што одговара терапијској примени овог агенса. Вршећи анализу показатеља запаљења на системском нивоу, укључујући хуморалне параметре (концентрација акутно фазних протеина и проинфламаторног цитокина, интерлеукина 6 / IL-6 у плазми, активност основних ензима антиоксидативне одбране супероксид дисмутазе и каталазе у еритроцитима), као и квантитативне и квалитативне промене леукоцита периферне крви, посебно полиморфонуклеарних леукоцита (PMN), као ћелијских параметара запаљења, Весна Субота је анализирала проинфламаторни потенцијал варфарина. Испитивањем промена главних аспеката функције PMN *in vitro* (оксидативна активност, продукције цитокина фактора некрозе тумора / TNF и IL-6 и способност адхезије за нећелијски матрикс), као и миграције и екстравазације PMN у циљна ткива *in vivo* помоћу субкутано имплантираних стерилних поливинилских сунђера, кандидаткиња је испитала механизме дејства варфарина на полиморфонуклеарне ћелије. Резултати ове дисертације показују да варфарин има имуномодулаторни капацитет, било да доспева у организам кроз кожу или оралним путем, али да се врста ефекта разликује зависно од пута изложености или од испитиване ћелијске активности. Епикутана апликација варфарина је показала проинфламаторни потенцијал на основу промене ензима антиоксидативне одбране, док оралну примену карактерише и акутно фазни одговор. Када су у питању промене активности леукоцита периферне крви, варфарин примењен у било коме од два режима испољава диференцијални ефекат: стимулише готово све аспекте оксидативне активности полиморфонуклеарних леукоцита, али смањује продукцију TNF инхибицијом на транскрипционом нивоу. Варфарин који у организам доспева кроз кожу инхибира и продукцију и експресију IL-6, али стимулише експресију молекула од важности за миграцију полиморфонуклеарних леукоцита (CD11b), док ови ефекти изостају у оралном режиму примене. Стимулаторни ефекат акутно примењеног варфарина на CD11b доприноси повећању миграције полиморфонуклеарних леукоцита *in vivo* (у субкутано имплантиране сунђере), али слаб утицај на активност ћелија изолованих из сунђера указује на значај системског окружења у остваривању утицаја на ћелијску активност.

Резултати ове студије су показали имуномодулаторни капацитет варфарина, чиме се проширује листа биолошких активности овог агенса које нису везане за хемостазу. Ово може да буде важно за критичко сагледавање ризика од професионалне изложености и нестручне примене као родентицида, а посебно клиничке примене варфарина (као лека), ако се има у виду да се овај агенс, и поред појаве нових оралних антикоагуланата са директним инхибиторним дејством на факторе коагулације Па и Ха, и даље сврстава у оне који се најчешће преписују као антикоагулантна терапија.

Анализа докторске дисертације:

УВОД докторске дисертације Весне Субота се састоји од 6 делова. У првом делу је дат осврт на истријат коришћења варфарина као отрова (родентицида) и као лека (терапијског средства). Други део је посвећен приказу структурних својстава варфарина као деривата кумарина, апсорпцији, транспорту и елиминацији варфарина. У трећем делу описани су механизми деловања варфарина као антикоагуланта. Детаљно је дат приказ савремених података о процесу коагулације крви, факторима коагулације, циклусу витамина К и значају његове редуковане форме за процес карбоксилације глутаминских остатака у прекурсорској (неактивној) форми фактора коагулације која је неопходна за стварање биолошки активних форми ових фактора. Посебно је описан ефекат варфарина на циклус витамина К. Такође је дат осврт на механизме резистенције на варфарин. Четврти део обрађује протеине ван процеса хемостазе којима је потребан витамин К за стварање биолошки активних форми. Дат је преглед ових витамин К-зависних протеина са нагласком на то да варфарин захваљујући инхибицији циклуса витамина К може да делује и на ове протеине. Пети део је посвећен приказу до сада познатих штетних ефеката варфарина на физиолошке процесе у којима учествују витамин-К зависни протеини. Најпре се дају подаци о крварењу као ефекту неусклађене терапије варфарином или акцидентата услед професионалне изложености током производње или нестручне примене варфарина као родентицида на факторе коагулације, затим се обрађују ефекти који доводе до некрозе коже и потом редом ефекти на протеине зависне од витамина К али који не учествују у процесу коагулације. У шестом делу се даје приказ ефекта варфарина на процесе који не зависе од витамина К. На овај део увода се надовезује сегмент који наводи малобројне податке о ефектима варфарина на компоненте имунског система, чиме су дате смернице за овај докторски рад и у светлу тога постављени **ЦИЉЕВИ РАДА**. Они су се односили на испитивање имуномодулаторног потенцијала варфарина код пацова изложених његовом деловању у два режима примене: (1) акутна епикутана, која одговара ситуацији професионалне изложености и (2) субакутна орална, која одговара терапијској примени овог агенса.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описане су биохемијске методе и методе ћелијске имунологије које су коришћене у реализацији постављених циљева. Најпре су наведени реагенси, раствори и антитела која су коришћена у експерименталним процедурама. Затим су наведене лабораторијске животиње (генетски високо сродни пацови соја Dark Agouti/DA) коришћене током израде експеримената као и дозе и начин примене варфарина (епикутано, орално и у поливинилском сунђеру који се поставља субкутано). Следи опис метода које су коришћене за анализу биохемијских параметара (протромбинског времена као основног биолошког ефекта варфарина, акутно фазних протеина фибриногена, хаптоглобина, Ц-реактивног протеина и албумина) и хематолошких параметара. Затим је описан поступак изолације полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви помоћу декстрана и густинског медијума за сепарацију леукоцита и метода одређивања метаболичке вијабилности леукоцита помоћу теста редукције тетразолијумове соли МТТ. Оксидативна активност полиморфонуклеарних леукоцита је одређивана мерењем продукције азот оксида (реакција по Griess-u), одређивањем нивоа активности унутарћелијске мијелопероксидазе и помоћу редукције тетразолијумове соли NBT у формазан, која мери продукцију супероксидног анјона. Адхезија је мерена помоћу теста адхезије за пластику, а експресија CD11b је одређивана помоћу проточне цитофлуориметрије. Продукција TNF и IL-6 од стране полиморфонуклеарних леукоцита, као и ниво IL-6 у плазми су одређивани помоћу имуноензимског теста на чврстој подлози (ELISA), а експресија гена за ове цитокине

помоћу реакције ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR), са приказом секвенци коришћених олигонуклеотида. Приказ хистолошке анализе је укључио опис припреме ткива, и бојење препарата хематоксилин-еозином. За одређивање активности ензима антиоксидативне одбране у мембрани еритроцита коришћени су еритроцити добијени центрифугирањем хепаринизираних крви. Дати су описи метода за одређивање активности укупне супероксид дисмутазе и каталазе.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, кандидаткиња је систематски и јасно изложила резултате извршених истраживања. Руководећи се постављеним циљевима резултати су подељени у две целине, у којима су на прегледан начин и графички документовано изнети добијени експериментални подаци. У првом делу приказани су резултати ефеката акутног епикутаног третмана варфарином (три дана за редом у дози од 10 μg и 100 μg натријум варфарина на површини од $\sim 16 \text{ cm}^2$). Продужење протромбинског времена, који је основни биолошки ефекат варфарина, показало је о перкутану апсорпцију варфарина и доспевање у генералну циркулацију. Епикутана апликација не доводи до промена концентрације протеина акутне фазе и IL-6, али је запажен пораст активности каталазе при вишој дози варфарина. У овом режиму примене варфарина запажене су квантитативне промене леукоцита периферне крви (повећање броја неутрофилних и еозинофилних леукоцита уз истовремено смањење броја лимфоцита). Евидентне су и друге хематолошке промене (пад вредности хематокрита, значајно снижење средњег волумена еритроцита, снижење укупног хемоглобина, као и промене индекса везаних за узајамни однос хемоглобина, броја и волумена еритроцита) након излагања вишој дози овог агенса. Ова доза доводи и до снижења броја тромбоцита уз повећање њихове просечне запремине. Варфарин није испољио цитотоксичност за полиморфонуклеарне леукоците, али је довео до промена њихове активности. Повећање броја ћелија које исказују CD11b је запажено при обе дозе, али без ефекта на адхезију. Овај агенс исказује диференцијални ефекат на оксидативну активност полиморфонуклеара: повећање мијелопероксидазе (MPO) и способности редукције тетразолијумове соли NBT након стимулације липополисахаридом (LPS) (при вишој дози), али смањење нестимулисаних продукција азот-оксида (NO) при обе дозе, уз непромењену продукцију након стимулације LPS-ом. Варфарин који доспева у организам кроз кожу доводи до смањења нестимулисаних продукција проинфламаторних цитокина TNF и IL-6 (као резултат инхибиције на транскрипционом нивоу), а запажено је и смањење продукције ових цитокина након стимулације LPS-ом.

У другом делу су приказани резултати ефеката субакутног оралног третмана (30 дана у дози од 0.35 mg/L и 3.5 mg/L натријум варфарина у пијаћој води). На основу запремине попијене воде и коришћењем формуле за прерачунавање еквивалентне дозе за употребу код људи (енгл. Human Equivalent Dose, HED) износ дневне дозе коју су примили пацови је 0.005 mg/kg за нижу дозу и 0.046 mg/kg за вишу дозу. Ово одговара конзумацији код људи од 0.30 mg/60 kg за нижу, односно 2.7 mg/60 kg за вишу дозу (60 kg је узето као просечна маса човека). Продужење протромбинског времена говори о антикоагулантном ефекту варфарина код пацова. Орална примена варфарина је довела до успостављања системске запаљењске реакције коју су карактерисале повећање протеина акутне фазе хаптоглобина и Ц-реактивног протеина и IL-6 (при обе дозе) и фибриногена при вишој дози, као и промене активности супероксид дисмутазе и каталазе (при вишој дози). Виша доза варфарина је такође довела до повећања броја неутрофилних леукоцита, али до смањења броја лимфоцита. Што се тиче осталих хематолошких параметара запажено је благо, али значајно, снижење волумена еритроцита праћено значајним повећањем средње концентрације хемоглобина код обе дозе у односу на контролну групу. Није забележена значајна промена у погледу броја тромбоцита, али је уочено дозно зависно снижење њиховог просечног волумена. Варфарин није био директно токсичан за

полиморфонуклеарне леукоците, али је утицао на квалитативне промене ових ћелија. Иако није дошло до повећања броја ћелија које исказују CD11b (при обе дозе), запажено је повећање адхезивности након стимулације са форбол миристатином (при вишој дози варфарина). Орална примена више дозе варфарина је такође довела до стимулације свих аспеката оксидативне активности полиморфонуклеарних леукоцита укључујући повећање активности MPO и способности редукције NBT, као и продукције NO након стимулације форбол миристатином односно LPS-ом. Међутим, запажен је диференцијални ефекат на њихов цитокински одговор (снижење TNF при вишој дози варфарина, као резултат инхибиције на транскрипционом нивоу, без утицаја на IL-6). И поред повећања броја полиморфонуклеарних леукоцита који су мигрирали у сунђер, запажен је слаб ефекат на активност ових ћелија, што је указало на значај системског окружења у остваривању утицаја на ћелијску активност.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња детаљно и садржајно анализира резултате до којих је дошла у својим истраживањима. Дискусија сагледава резултате приказане у претходном поглављу па је сходно томе подељена у два дела и разматра их са аспекта недостатака података о ризицима професионалне изложености коже варфарину, као и у контексту ретких података добијених у истраживањима непожељних ефеката варфарина у којима је детектовано присуство компоненти имунског система код људи на терапији варфарином. Повећање активности каталазе, као и промене броја и активности PMN леукоцита након епикутане апликације варфарина се разматрају као системски проинфламаторни ефекти варфарина. Дискутује се могућа међусобна повезаност оксидативних активности полиморфонуклеарних леукоцита у складу са литературним подацима о утицају реактивних врста кисеоника на активацију ових ћелија. Посебно значајан део дискусије је посвећен супресивном ефекту варфарина на продукцију проинфламаторних цитокина TNF и IL-6. Инхибиција продукције TNF се разматра са аспекта повећања каталазе, будући да супстрат за овај ензим, водоник пероксид, по подацима из других експерименталних система, може да буде одговоран за негативан ефекат на продукцију цитокина. Инхибиторни ефекат на продукцију TNF употпуњује литературне податке *in vitro* о овом цитокину као циљном молекулу за варфарин и указује на IL-6 као још једну цитокинску мету за варфарин. Супресија наведених цитокина сагледава се у овом делу дискусије као покушај организма да ограничи проинфламаторну активност ћелија и поврати хомеостазу. Кандидаткиња у дискусији истиче обимну употребу антикоагулантних родентицида, недоследност и неспровођење заштитних мера при употреби и слабо спровођење хигијене руку пре и после употребе и апликације родентицида, као и некомпетентну употребу овог препарата у кућним условима и сматра да кумаринске родентициде треба третирати као скривену опасност за особе које рукују овим агенсом. Осим тога, у дискусији је изнет став о потенцијалној користи података из ове дисертације за дизајнирање алтернативне терапије оралној варфаринској терапији у виду трансдермалних система за примену варфарина или нових технолошких решења која укључују супстанце или смеше које појачавају пермеацију варфарина.

Део дискусије посвећен последицама оралне примене варфарина такође разматра проинфламаторни ефекат овог агенса. Промене у активности оба еритроцитна ензима антиоксидативне заштите се разматрају као резултат потребе за активацијом заштитних механизма и неопходности уклањања продуката оксидативног стреса из плазме, а ради заштите ткива и ограничења његове даље озледе. Присуство хуморалних чинилаца инфламације на системском нивоу се дискутује са аспекта ретких података о повећању циркулишућег IL-6 код пацијената на варфаринској терапији високим дозама и повећању појединих протеина акутне фазе.

Активација полиморфонуклеарних леукоцита се сагледава са аспекта међусобног утицаја оштећења еритроцита и нивоа IL-6 у циркулацији, а у светлу литературних

података о подстицању активације ових леукоцита као компликованом процесу који зависи од различитих стимулуса и агониста ћелијских рецептора. Промене у броју неутрофила и лимфоцита периферне крви вероватно су последица редистрибуције леукоцита због потреба за њиховом миграцијом у ткива, где ће испољити своје ефекторске активности. Управо због ових ефеката као и због супресије продукције TNF, дискусија указује на потребу разматрања сложености ефеката орално примењене терапије варфарином.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња износи више појединачних закључака о имуномодулаторном ефекту варфарина који су произашли из резултата истраживања докторске дисертације, уз општи закључак да описани ефекти проширују листу биолошких активности варфарина које нису везане за хемостазу и указивање на потребу за даљим испитивањима штетних ефеката овог агенса, која могу да помогну критичком сагледавању ризика од професионалне изложености са једне стране, и клиничке примене варфарина, као лека, ако се има у виду да се овај агенс и даље сврстава у оне који се најчешће преписују као антикоагулантна терапија.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** са 291 библиографском јединицом релевантном по избору, види се озбиљан и студиозан приступ проблематици од стране кандидаткиње.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M22**

Subota V., Mirkov I., Demenesku J., Popov Aleksandrov A., Ninkov M., Mileusnic D., Kataranovski D., Kataranovski M. Transdermal toxicity of topically applied anticoagulant rodenticide warfarin in rats. *Environ. Toxicol Pharmacol.*, 2016, 41: 232-40.

2. **M23**

Popov A., Belij S., Subota V., Zolotarevski L., Mirkov I., Kataranovski D., Kataranovski M. Oral warfarin affects peripheral blood leukocyte IL-6 and TNF α production in rats. *J. Immunotox.*, 2013, 10: 17-24.

Мишљење и предлог Комисије:

Анализа докторске дисертације кандидаткиње **Весне С. Субота** под насловом „**Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова**“ показује да она представља оригиналан научни рад у области Биомедицине и уже Поремећаја коагулације. Имајући у виду оскудност података о ефектима варфарина на компоненте имунског система, предмет ове дисертације био је испитивање имуномодулаторног потенцијала варфарина. У конципирању истраживања кандидаткиња је имала у виду здравствене ризике професионалне изложености варфарину као родентициду преко контакта са кожом и клиничких манифестација неусклађене варфаринске терапије, те је као циљеве поставила испитивање ефеката поновљене епикутане примене као и субкутане оралне изложености пацова варфарину. Кроз опсежан експериментални рад кандидаткиња је успешно испунила постављене циљеве истраживања и показала имуномодулаторни потенцијал примене варфарина у оба режима примене. Коришћењем више различитих експерименталних приступа показан је проинфламаторни ефекат варфарина на системском нивоу, али диференцијални ефекат (и стимулаторни и супресивни) на различите аспекте функције полиморфонуклеарних леукоцита. Анализа *in vivo* миграције

леукоцита у субкутано имплантиране поливинилске сунђере је указала на значај системског окружења у остваривању утицаја варфарина на ћелијску активност. Тумачење и критичко разматрање резултата ове дисертације указују на то да кандидат добро познаје теоријске основе научне области којој проблематика обрађена у дисертацији припада. Као резултат, део истраживања приказаних у овој дисертацији је публикован. Ови нови подаци о потенцијалу варфарина да модулира имунске реакције указују на то родентициде на бази варфарина треба третирати као скривену опасност за особе које рукују овим препаратима, и дају допринос критичком сагледавању штетних ефеката клиничке примене варфарина, као лека, ако се има у виду да се овај агенс и даље сврстава у оне који се најчешће преписују као антикоагулантна терапија.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације, научни значај добијених резултата, као и личне квалитете кандидата, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати приложени Реферат и одобри јавну одбрану докторске дисертације **„Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова“** кандидаткиње **Весне С. Субота**, и стицање академског звања доктора биолошких наука.

КОМИСИЈА:

др Јанко Пејовић, доцент, Медицински факултет
Војно-медицинске академије, Универзитет одбране у
Београду

др Милена Катарановски, редовни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Драган Катарановски, редовни професор, Биолошки
факултет, Универзитет у Београду

др Саша Василијић, ванредни професор, Медицински
факултет Војно-медицинске академије, Универзитет
одбране у Београду

др Александра Попов Александров, научни сарадник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша
Станковић“, Универзитет у Београду

У Београду, 30. 06. 2016. године

