

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -  
БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.07.2021. године, на основу молбе ментора, др Сања Глишић, научног саветника Института за нуклеарне науке Винча, Института од Националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Драгиње Б. Радошевић**, истраживача сарадника Института за нуклеарне науке Винча, Института од Националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, под насловом: "*In silico* одабир лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора М2 протеина вируса грипа и провера њихове активности *in vitro*", у саставу:

Др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошког факултета Универзитета у Београду

Др Сања Глишић, научни саветник, Института за нуклеарне науке Винча, Института од Националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду

Др Милан Сенћански, виши научни сарадник, Института за нуклеарне науке Винча, Института од Националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Драгиње Радошевић, истраживача сарадника, под називом „*In silico* одабир лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора М2 протеина вируса

грипа и провера њихове активности *in vitro*”,“ садржи 53 нумерисаних страна текста, укључујући 9 слика и 6 табела. Дисертација је структурирана на следећи начин:

уводне стране (12 страна које нису нумерисане), које обухватају насловну страну на српском и енглеском језику, податке о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, скраћенице и садржај;

- текст по поглављима (7 поглавља), која чине Увод (16 страна, 3 слика), Хипотеза и циљеви (1 страна), Материјал и методе (7 страна, 1 табела), Резултати (9 страна, 6 слика, 5 табела), Дискусија (4 страна), Закључци (1 страна) и Литература (16 страна са 226 библиографских јединица);

- завршне стране (5 страна које нису нумерисане), које садрже Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

### **Анализа докторске дисертације**

У **Уводу** је изложен свеобухватан преглед постојећих података из литературе и приказ истраживања значајних за теоретско сагледавање научне проблематике докторске дисертације. Дата је класификација вируса инфлуенце, описана је структура и животни циклус вируса, као и приказ епидемијског и пандемијског потенцијала вируса инфлуенце. Посебна пажња је посвећена приказу савремене антивирусне терапије инфлуенце. Такође су детаљно описани проблеми садашње стандардне терапије које су подстакли настанак овог научног рада. Обухваћени су сви кључни аспекти превенције и лечење вируса инфлуенце са деловима посвећеним сезонској вакцинацији против инфлуенце, Детаљно је образложен разлог и потреба за развојем нових лекова против инфлуенце. Услед све учесталије појаве вируса резистентних на постојеће лекове, као и претње од могућности појаве пандемијских вируса, јавила се потреба за убрзаним развојем нових лекова у којој је главна препрека веома висока цена развоја новог лека (1.5 до 2 милијарде долара) и дуг процес развоја (12 до 15 година). Савремен приступ у откривању лекова који омогућава брзо проналажење ефикасне терапије уз материјалну уштеду је пренамена лекова, при чему се за одобрене лекове предлаже нова индикација. Пренамена лекова представља најефикаснију стратегију за изналажење нових лекова за многе вирусне болести, укључујући и грип. Дат је приказ и два клиничка испитивања са репозиционираним лековима за грип.

Увод садржи приказ процеса развоја лекова, пренамене лекова, као и опис база података које су потребне за процес компјутерске пренамене лекова. Посвећена је посебна пажња приказу компјутерског дизајна лекова, који има кључну улогу у развоју терапија заснованих на малим молекулима

У поглављу **Циљ рада** дефинисани су следећи главни циљеви:

1. Одређивање биоинформатичког критеријума за *in silico* претраживање молекулских библиотека у циљу идентификације кандидата за лекове двоструких инхибитора М2 јонског канала WT инфлуенце А вируса и вируса који су резистентни на амантадин са мутацијом S31N у протеину М2.
2. Одређивање потенцијалних кандидата за двоструке инхибиторе М2 јонског канала (WT и S31N мутанта) инфлуенце А претраживањем базе одобрених лекова DrugBank применом предложеног биоинформатичког критеријума за одабир лекова у комбинацији са хемоинформатичким методама виртуелног скрининга молекула.
3. Испитивање антивирусне активности у *in vitro* експериментима предложених најбољих кандидата на основу *in silico* критеријума за селекцију за инхибиторе М2 јонског канала (WT и S31N мутанта) инфлуенце А

У поглављу **Материјал и методе** је приказан преглед експерименталних и биоинформатичких поступака коришћених у докторској дисертацији.

У овом делу тезе је такође дат и детаљан приказ концепта дугодосежних међумолекулских интеракција у биолошким системима дефинисаног молекулским дескрипторима AQVN и ЕИР .

За одређивање вредности AQVN и ЕИР и успостављање биоинформатичког критеријума AQVN/ЕИР за ВС на бази добијених података за познате инхибиторе М2 протеина (тренинг сет) као и за израчунавање AQVN и ЕИР вредности за све лекове из базе података DrugBank (<http://www.drugbank.ca>) коришћен је софтвер Формула калкулатор из ЕИР/ISM софтверске платформе (Перовић В, Развој мултифункционалне биоинформатичке платформе засноване на потенцијалу електрон-јон интеракције биолошких молекула. 2013. Математички факултет, Универзитет у Београду), развијене у Институту Винча.

Једињења селектована биоинформатичким виртуелним скринингом даље су подвргнута лиганд заснованом и структурно заснованом виртуелним скринингом.

За лигандно засновани виртуелни скрининг у циљу одабира двојних инхибитора М2 је коришћен је софтвер Pentacle, а за структурно базирани виртуелни скрининг – софтвер Autodock Vina, ADT Tools и Biovia Discovery Studio Visualization за визуелизацију резултата.

Описани су експериментални поступци испитивања антивирусне активности репозиционираних лекова. Антивирусна активност репозиционираних лекова из базе DrugBank који су селектовани биоинформатичким и хемоинформатичким виртуелним скринингом је тестирана против пандемијског pH1N1 вируса и H3N2 сезонског вируса грипа у *in vitro* у култури бубрежних ћелија пса (eng. Madin-Darby canine kidney, MDCK).

MDCK ћелијска линија се најчешће користи за испитивање антивирусног деловања лекова против грипа и подложна је инфекцији различитим сојевима грипа.

Поглавље **Резултати** је подељено на пет потпоглавља: 1. Одређивање ЕИР/АQVN биоинформатичког критеријума., 2. Одабир лекова из базе DrugBank., 3. Хемоинформатичка анализа., 4. Испитивање антивирусне активности цикримина *in vitro*., 5. Испитивање *in vitro* антивирусне активности гванетидина.

У првом поглављу су приказани резултати анализе познатих инхибитора М2 јонског канала инфлуенце на основу којих је одређен је биоинформатички критеријум заснован на ЕИР/АQVN параметрима за виртуелно претраживање молекулских библиотека у циљу идентификације кандидата за двоструке инхибиторе М2 јонског канала WT инфлуенце А вируса и вируса са мутацијом S31N у протеину М2. На основу овог критеријума који је коришћен као филтер при скринингу базе одобрених лекова DrugBank у циљу идентификације кандидата за лекове који су двоструки инхибитори М2 јонског канала вируса инфлуенце типа А изабрани су кандидати за двоструке инхибиторе. Применом ЕИР/АQVN критеријума за виртуелни скрининг одабрано је 39 лекова од 2627 лекова из базе DrugBank.

Затим су у трећем поглављу резултата приказани резултати хеминформатичке анализе која је примењена на једињења селектована биоинформатичким виртуелним скринингом. Приказан је ток анализе изабраних кандидата за лекове лиганд заснованим и структурно заснованим виртуелним скринингом. После примене хемоинформатичког критеријума за виртуелни скрининг који се заснива на међусобној структурној сличности (лиганд засновани виртуелни скрининг) познатих инхибитора М2 протеина са кандидатима за лекове - двоструке инхибитора М2 јонског канала WT инфлуенце А вируса и вируса са мутацијом S31N у протеину М2 од 39 лекова је предложено пет најбољих кандидата, а утврђено је да је најбољи међу њима гванетидин. Описани су резултати добијени молекулским докигом пет кандидата на дивљи тип М2 и мутирани М2 S31N који су показали да је кандидат са најнижом енергијом везивања и једнаким афинитетом за оба канала лек цикримин. У четвртном и петом поглављу су представљени су резултати експеримента *in vitro* за утврђивање антивирусне активности предложених кандидата за двоструке инхибиторе. Описани су експерименти који су потврдили предложену активност цикримина против два различита подтипа вируса инфлуенце А пандемијског H1N1 2009 и H3N2, а такође су приказани су и експерименти у којима је утврђена *in vitro* активност гванетидина против пандемијског вируса инфлуенце H1N1 2009 у култури MDCK ћелија. Сумирајући добијене резултате кандидат је истакао да предложени биоинформатички критеријум представља основ за селекцију двоструких инхибитора М2 јонских канала WT инфлуенце А вируса и вируса са мутацијом S31N у протеину М2 из било које молекулске библиотеке малих молекула.

У поглављу **Дискусија** су резултати биоинформатичке анализе на адекватан начин размотрени у односу на податке познате из литературе, дискутовани су критички и објективно указивањем на сагласности и разлике. Дискутован је значај и актуелност примене *in silico* молекуларног дизајна у развоју терапија заснованих на малим молекулима. Наглашен је значај примене комбинованог *in silico* приступа у овом раду обзиром да је веома тешко да се применом само једне рачунарске методе анализирају сложене биолошке структуре и процеси пошто свака метода има своје предности и ограничења. Пракса је показала да истовремена примена комбинованих *in silico* приступа омогућава избор лекова за пренамену који у каснијим експерименталним тестирањима дају много боље резултате.

Дискутован је значај избора пренамењених лекова, који су експериментално тестирани у односу на податке из литературе а такође и у складу са резултатом којим је показано да су амантадин и цикримин у истом ЕИП/AQVN домену, па се на основу резултата претходних студија може очекивати да ова два лека деле исте терапијске циљеве. Дискутована су и остали *in silico* предложени лекови за пренамену у докторској дисертацији у односу на податке из литературе. Поред тога дискутован је и значај развоја нових база података, у којима су обједињени литературни подаци о пренамењеним лековима са антивирусном активношћу са подацима о биолошким, хемијским, структурним и патогеним својствима вируса, у терапеутском одговору на могуће будуће вирусне епидемије и пандемије.

Примена *in silico* критеријума заснованог на молекулским дескрипторима AQVN и ЕИП у ранијим студијама је успешно коришћена за селекцију лекова за лечење вирусних и бактеријских инфекција Све учесталија појава вируса резистентних на постојеће лекове као и стална претња од могућности појаве нових пандемијских вируса грипа, као и мала ефикасност сезонских вакцина за грип условили су потребу за убрзаним развојем нових лекова. Пренамена лекова је нов, савремен приступ и најефикаснија стратегија за изналагање нових лекова за многе вирусне болести, укључујући и грип.

Резултати ове докторске дисертације пружају значајан допринос развоју нових лекова за грип пошто предложени *in silico* критеријум за виртуелно претраживање молекулских библиотека за селекцију једињења која инхибирају вирус омогућава брже и јефтиније откривање нових лекова за грип и пренамену постојећих за лечење ове инфективне болести. Примена овог приступа може бити од посебног значаја у случајевима појаве новог пандемијског вируса против кога не постоји вакцина и ширења сезонских вируса који су резистентни на постојеће лекове када је потребно у кратком временском року развити нове терапеутике за лечење инфлуенце.

Сумирајући добијене резултате кандидат

### **Закључује:**

1. Одређен је биоинформатички критеријум заснован на EIP/AQVN параметрима за *in silico* ретраживање молекулских библиотека у циљу идентификације кандидата за лекове - двоструке инхибитора M2 јонског канала WT инфлуенце А вируса и вируса са мутацијом S31N у протеину M2 на основу анализе заједничког домена у коме се налази више од 80% активних инхибитора M2 јонског канала инфлуенце.
2. На основу примене EIP/AQVN биоинформатичког критеријума за виртуелни скрининг одабрано је 39 лекова од укупно 2627 одобрених лекова из базе DrugBank који су предложени као потенцијални кандидати за двоструке инхибиторе M2 јонских канала вируса инфлуенце типа А.
3. На основу хемоинформатичког критеријума за виртуелни скрининг, заснованог на међусобној структурној сличности (лиганд засновани виртуелни скрининг) познатих инхибитора M2 протеина са кандидатима за лекове - двоструке инхибитора M2 јонског канала WT вируса инфлуенце А и вируса са мутацијом S31N у протеину M2, од 39 лекова је предложено пет најбољих кандидата, а као најбољи међу њима одабран је гванетидин. Молекулским докингом пет најбољих кандидата на дивљи тип M2 и мутирани M1 S31N као молекул са најнижом енергијом везивања и једнаким афинитетом за оба канала је идентификован лек цикримин.
4. Експериментални резултати су потврдили предвиђену активност цикримина против два различита подтипа вируса грипа А пандемијског п H1N1 и сезонског H3N2.
5. Показана је је *in vitro* активност гванетидина против пандемијског вируса грипа пандемијског Х1Н1.
6. Предложени биоинформатички критеријум представља основ за селекцију двоструких инхибитора M2 јонских канала WT вируса инфлуенце типа А пандемијског H1N1 и H3N2 и ових вируса са мутацијом S31N у протеину M2 виртуелним претраживањем молекулских библиотека.

Поглавље **Литература** садржи 16 страна са 226 библиографских јединица библиографских јединица, од којих је велики број новијег датума.

Дат је **Сажетак** на српском и енглеском језику.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

М21 - Рад у врхунском међународном часопису

1. **Radosevic, D.**, Sencanski, M., Perovic, V., Veljkovic, N., Prljic, J., Veljkovic, V., Mantlo, E., Bukreyeva, N., Paessler, S., & Glisic, S. (2019). Virtual Screen for Repurposing of Drugs for Candidate Influenza a M2 Ion-Channel Inhibitors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 67. **M21**

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00067/full>

М22 - Рад у истакнутом међународном часопису

1. Matejin S., Bukreyeva N., **Radosevic D.**, Sencanski M., Mantlo E., Veljkovic V., Glisic S., Paessler S. In vitro anti-influenza activity of in silico repurposed candidate drug cycrimine. *Antiviral Therapy*. 2019 ;24(8):589-593. **M22**

<https://www.intmedpress.com/journals/avt/abstract.cfm?id=3348&pid=31>

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Драгиње Радошевић, Б3009/2011 послата је дана 21.06.2021 на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 21.06.2021.

На основу увида у проверу оригиналности дисертација утврђено је да докторска дисертација констатујем да утврђено подударане текста износи 17%. Подударност текста у делу који се односи на оригиналан допринос кандидата садржан резултатима и дискусији и методологији, је минималан и односи се на подударане текста као последица претходно публикованих резултата докторандових истраживања и правилно цитиране методологије. Највећи степен подударности је утврђен у деловима увода који обухватају опште дефиниције и описе тренутног стања у проблематици која се обрађује у докторској дисертацији. Сви наведени општи делови увода који се преклапају су коректно цитирани, уз навођења извора.

На основу изложеног, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Драгиње Радошевић, под насловом „*In silico* селекција лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора М2 протеина вируса грипа и провера њихове активности *in vitro*”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Драгиње Радошевић је научни рад са јасно формулисаним циљевима, заснованим на детаљном познавању научне проблематике, са доследно планираним и проведеним истраживачким поступком и успешном реализованим циљевима истраживања. Резултати ове тезе, који су објављени у једном раду у врхунском међународном часопису (M21) и једном раду у истакнутом међународном часопису (M22), представљају оригиналан научни допринос у области биоинформатике и компјутерског дизајна лекова против инфлуенце.

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Драгиње Радошевић и предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да усвоји овај Извештај и кандидату Драгиње Радошевић одобри одбрану докторске дисертације под насловом „*In silico* одабир лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора M2 протеина вируса грипа и провера њихове активности *in vitro*”.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 15.07.2021. године

---

Др Горан Брајушковић, редовни професор  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

Др Сања Глишић, научни саветник,  
Института за нуклеарне науке Винча,  
Института од Националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду

---

Др Милан Сенћански, виши научни сарадник,  
Института за нуклеарне науке Винча,  
Института од Националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду