

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и орган који је именовao комисију 26.11.2019. године, Наставно-научно веће Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: проф. др Наташа Милић , редовни професор, Фармацеутска хемија, 28.01.2019. године, Катедра за фармацију, Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду др Весна Којић , научни сарадник, Биохемија, Токсикологија, 28.05.2014. године, Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду др Ивана Боришев , научни сарадник, Хемија, 30.09.2015. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Јелена, Стојан, Ћурчић
2. Датум рођења, општина, држава: 15.07.1984. године, Нови Сад, Република Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, дипломске академске студије фармације, дипломирани фармацеут
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија

2013. година, Клиничка медицина

5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:

-

6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:

-

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

***In silico* одређивање физичко-хемијских, фармакокинетских и токсиколошких параметара и *in vitro* испитивање антипролиферативне активности новосинтетисаних деривата Н-сукцинимиди**

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикана и сл.

Докторска дисертација је написана на 137 страна. Садржи све неопходне делове научног рада приказаних у 8 поглавља:

Прво поглавље – Увод (2 стране)

Друго поглавље – Општи део (27 страна)

Треће поглавље – Циљеви и хипотезе истраживања (2 стране)

Четврто поглавље – Материјал и методе истраживања (7 страна)

Пето поглавље – Резултати (63 стране)

Шесто поглавље – Дискусија (18 страна)

Седмо поглавље – Закључак (2 стране)

Осмо поглавље – Литература (16 страна)

Приказано је 41 табела и 24 слике. У литератури је цитирано 192 библиографске јединице. Кључна документацијска информација је написана на српском и енглеском језику и приложена је на почетку докторске дисертације.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов дисертације је јасно формулисан, разумљив је и прецизно упућује на садржај истраживања.

Увод је написан систематично и прегледно и јасно указује на значај проблематике којом се дисертација бави. Првобитно је истакнут значај сукцинимиди као фармаколошки активних молекула. У даљем тексту је, на концизан и разумљив начин, указано на потребу за развојем ефикасних и безбедних хемиотерапеутика, с освртом на резултате експерименталних истраживања деривата сукцинимиди са потврђеном антипролиферативном активношћу.

Општи део докторске дисертације обухвата девет потпоглавља. Прво потпоглавље описује значај сукцинимиди као биолошки активних молекула и објашњава потребу за синтезом нових једињења са структуром сукцинимиди. Друго потпоглавље говори о савременом приступу у дизајнирању лекова, чији је

циљ оптимизација фармакокинетских и токсиколошких карактеристика будућих кандидата за лек, применом *in silico* метода, уз минимизацију материјалних трошкова и уштеду времена. У раној фази развојног процеса примењују се QSAR, QSPR и QSTR методе, које квантификују однос између структурних карактеристика молекула и њихових биолошких особина. У следећа три потпоглавља описани су најважнији молекулски, фармакокинетски и токсиколошки дескриптори, који се користе у поменутих методама. Шеста целина даје приказ одређених типова молекулских рецептора, као активних места деловања лекова. У наредној целини дефинисана су емпиријска правила која на основу анализе база података о физичко-хемијским карактеристикама омогућавају брзу прелиминарну селекцију молекула са највећим потенцијалом за лекове, а које треба узети у разматрање за наредне фазе испитивања. У осмом потпоглављу дате су теоријске основе *in vitro* испитивања антипролиферативне активности према различитим туморским ћелијским линијама, уз опис теста одбацивања боје Трипан плаво (DET тест) и колориметријског теста са тетразолијумовим солима (МТТ тест). У последњем потпоглављу описане су основе молекулског докинга и потреба за одређивањем афинитета испитиваних једињења за везивање за естрогене рецепторе експримиране на ћелијама карцинома дојке.

Комисија сматра да је наслов рада прецизан и јасно формулисан У уводу је свеобухватно приказана проблематика којом се истраживање бави, а у Општем делу је детаљно дат приказ теоријских основа на којима се истраживање заснива.

Циљеви истраживања су јасно дефинисани. Свих пет циљева постављени су тако да могу да обезбеде одговоре на кључна питања везана за предмет истраживања и омогуће конкретне закључке. Први циљ је био да се испитају физичко-хемијске карактеристике 11 новосинтетисаних метил-етил-Н-арил-сукцинимиди, на основу структуре, применом различитих софтверских пакета. Други циљ је био да се на основу структуре одреде фармакокинетски параметри и токсиколошки предиктори за испитивана једињења, применом различитих софтверских пакета. Трећи циљ истраживања је био да се применом високоефикасне хроматографије на танком слоју (НР-TLC) испита ретенционо понашање испитиваних једињења, као и да се испита могућност примене ретенционих константи као мере липофилности. Четврти циљ је био да се испита антипролиферативна активност на одабраним културама ћелија карцинома и на здравим ћелијама фибробласта плућа и да се одреде IC_{50} вредности за свако једињење. Пети циљ истраживања је био да се применом молекулског докинга одреди енергија везивања сваког једињења из серије деривата сукуцинимиди за естрогене рецепторе и да се испита постојање корелације између везивања за естрогене рецепторе и антипролиферативног деловања на ћелије карцинома које експримирају ову врсту рецептора.

Хипотезе су адекватно постављене у односу на циљеве истраживања и јасно су формулисане. Претпоставке су биле да новосинтетисани деривати Н-метил-етил-арил-сукцинимиди имају потребна физичко-хемијска својства будућих

кандидата за лек; да поседују потребна фармакокинетска својства и ниску токсичност, предвиђене на основу хемијске структуре, применом QSPR, QSAR i QSTR метода; да експериментално одређене ретенционе константе за свако једињење могу да се користе као мера липофилности испитиваних једињења; да испитивана серија деривата сукцинимида показује значајну антипролиферативну активност на ћелијама карцинома (на основу експериментално одређених вредности IC₅₀), а да су безбедни за феталне фибробласте плућа; да анализирани сукцинимиди имају ниску енергију формирања комплекса са естрогеним рецепторима и да постоји корелација између *in silico* афинитета везивања за естрогене рецепторе и *in vitro* одређеног антипролиферативног ефекта на ћелијске линије карцинома које експримирају естрогене рецепторе.

Комисија сматра да су циљеви и хипотезе истраживања јасно и прецизно формулисани.

Материјал и методе истраживања у потпуности одговарају унапред дефинисаној методологији. Хроматографско испитивање 11 новосинтетисаних деривата сукцинимида је спроведено на Катедри за фармацију Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, применом високоефикасне хроматографије на танком слоју на обрнутим фазама, уз употребу мобилне фазе коју је чинила смеша воде са различитим органским растварачима у одређеним односима. Антипролиферативна активност је одређена на Институту за онкологију у Сремској Каменици, применом МТТ теста на пет различитих ћелијских линија хуманих карцинома и на здравим ћелијама фибробласта плућа. Различити софтверски пакети су коришћени за добијање података о физичко-хемијским, фармакокинетским и токсиколошким параметрима, уз посебан осврт на дескрипторе липофилности. Ови подаци су приказани табеларно. Молекулски докинг је урађен применом одговарајућих софтверских програма и база протеина познате структуре. За анализу добијених података коришћене су одговарајуће статистичке методе (дескриптивне статистичке методе, методе за тестирање статистичких хипотеза и методе за испитивање зависности).

Комисија сматра да је методолошки приступ, као и избор примењених аналитичких метода одговарајући, да су изабране статистичке методе обраде података у потпуности адекватне и примерене истраживачком задатку, што обезбеђује добијање поузданих резултата у складу са постављеним циљевима истраживања.

Резултати истраживања су приказани следљиво у складу са постављеним циљевима и хипотезама, у форми табела и слика, које су праћене јасним текстуалним тумачењем. У овом поглављу табеларно су приказани ретенциони параметри експериментално добијени хроматографском анализом и утврђена је њихова међусобна зависност. Ретенционе константе, за различите хроматографске системе коришћене у експерименту, корелиране су са *in silico* параметрима липофилности и растворљивости, и показују висок степен статистичке значајности, што је приказано и графички. Корелације

експериментално одређених константи липофилности са фармакокинетским и токсиколошким параметрима су приказане табеларно и графички у виду линеарних или параболичних функција, са очекивано високим вредностима коефицијената корелације. Афинитет везивања за молекулске рецепторе је посматран са аспекта липофилности, да би се установио потенцијал за испољавање нежељених ефеката испитиваних једињења. Антипролиферативна активност, детерминисана IC_{50} вредностима, је регистрована у односу на ћелије одређених линија хуманих карцинома, између осталих и према ћелијама естроген зависног карцинома дојке, али не и према здравим ћелијама фибробласта плућа. Цитотоксичност је зависна од концентрације једињења којом се третирају културе ћелија, што је приказано графички и табеларно. На крају је разматрана веза између афинитета за естрогене рецепторе и цитотоксичне активности у односу на ћелије естроген зависног хуманог карцинома дојке, а добијене линеарне регресије су графички приказане. Испитивана једињења поседују ниску енергију формирања комплекса са естроген рецептором алфа. Постоји тенденција пораста антипролиферативног ефекта на ћелије естроген позитивног карцинома дојке са смањењем енергије формирања комплекса са естрогеним рецепторима.

Комисија сматра да су резултати оригинални и реално приказани, јасни за интерпретацију, са научног аспекта значајни и свеобухватни.

Дискусија је приказана прегледно и систематично у односу на след приказаних резултата. Искрпно анализира добијене резултате, уз упоређивање са резултатима из актуелне литературе. Дискусија је свеобухватна, прецизно и јасно написана, а коментари и тумачења добијених резултата су јасна и логична и омогућавају извођење правилних закључака.

Комисија сматра да је дискусија исцрпна, прецизна и свеобухватна, уз критички осврт у односу на актуелну литературу, те значајно доприноси вредности ове дисертације.

Закључак је формулисан јасно и прегледно и утемељен је на резултатима оригиналног истраживања.

Комисија сматра да закључци представљају логичан одговор на постављене хипотезе и да су утемељени на резултатима који су добијени применом адекватне методологије.

У последњем поглављу Литература наведено је 192 библиографске јединице, цитиране у докторској дисертацији. Избор литературе је изведен на основу актуелности и значаја за област истраживања којом се бави ова дисертација.

Комисија сматра да је литература актуелна, прецизно цитирана и адекватна проблематици ове дисертације.

Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

1. Milosevic M, Kojic V, **Curcic J**, Jakimov D, Milic N, Banjac N, Uscumlic G, Kaliszan R. Evaluation of in silico pharmacokinetic properties and in vitro cytotoxic activity of selected newly synthesized N-succinimide derivatives. J Pharm Biomed Anal 2017;137:252-7. (M21)
2. Karadžić Banjac M, Kovačević S, Podunavac Kuzmanović S, Milošević N, **Ćurčić J**, Vulić J, Šeregelj V, Banjac N, Ušćumlić G. Chromatographic and computational screening of anisotropic lipophilicity and pharmacokinetics of newly synthesized 1-aryl-3-ethyl-3-methylsuccinimides. Comput Biol Chem. 2019; doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.107161 (M22)
3. Milošević N, Milanović M, Milić N, **Ćurčić J**, Kojić V, Jakimov D, Petković Cvetković J, Ušćumlić G. In vitro and in silico evaluation of antiproliferative activity and receptor binding affinity of newly synthesized succinimide derivatives. SETAC Europe 29th Annual Meeting Abstract Book; 2019 May 26-30; Helsinki, Finland; 2019. p.159-60. (M34)
4. Milošević N, Milić N, Milanović M, **Ćurčić J**, Petković Cvetković J, Ušćumlić G, Banjac N. Lipophilicity influence on estrogen binding affinity of newly synthesized succinimide derivatives. SETAC Europe 29th Annual Meeting Abstract Book; 2019 May 26-30; Helsinki, Finland; 2019. p.160. (M34)
5. **Curcic J**, Milosevic N, Kojic V, Milic N, Uscumlic G, Banjac N. Application of isocratic hydrophobic index obtained by RP-TLC of some succinimide derivatives in QSA(P)R studies. Macedonian Pharmaceutical Bulletin of the 6th Congress of Pharmacy in Macedonia with international participation; 2016 Jun 1-5; Skopje, Macedonia. Skopje: Macedonian Pharmaceutical Association; 2016. pp.555-56. (M34)

6. **Čurčić J**, Milošević N, Kojić V, Milić N, Ušćumlić G, Banjac N. In silico evaluation of aquatic toxicity of newly synthesized succinimide derivatives. Book of abstracts of 18th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health. Novi Sad, Serbia, 02-04 June 2016; Novi Sad: University of Novi Sad, Faculty of Technology: 2016. pp.46-7. (M34)

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

- Ретенционе константе R_M^0 , експериментално добијене применом реверзно-фазне високоефикасне хроматографије на танком слоју (RP-HP TLC), дају статистички значајне линеарне корелације са софтверски израчунатим $\log P$ и $\log D$ вредностима, што значи да могу да се користе као алтернативна мера липофилности једињења.
- Статистички значајне линеарне корелације између ретенционих параметара R_M^0 и S имплицирају на закључак да се и параметар S равноправно може користити као показатељ липофилности. То потврђују и регресионе једначине са високим степеном корелације између параметра S и *in silico* параметара липофилности $\log P$ и $\log D$.
- На основу података о физичко-хемијским дескрипторима, добијених помоћу софтверских пакета, и применом емпиријских правила, за испитивану серију деривата сукцинимида предвиђају се пожељне фармакокинетске карактеристике. Ниске вредности константе апсорпције K_a указују на добру и брзу апсорпцију након оралне администрације. Волумени дистрибуције V_d испитиваних једињења су средњих вредности, што значи да неће доћи до акумулације у ткиву пацијената. Афинитет за протеине плазме је релативно мали, због чега је могућ безбедан режим дозирања. За већи број испитиваних једињења може се очекивати добра пермеација кроз крвно-мождану баријеру, што може бити разлог испољавања нежељених ефеката на нивоу ЦНС-а.
- Високо значајне корелације између фармакокинетских параметара и експериментално одређених хроматографских параметара R_M^0 и S , указују на то да фармакокинетско понашање испитиваних једињења зависи пре свега од њихове липофилности и да се на основу познавања липофилности може предвидети АДМЕ.
- На основу *in silico* података о LD_{50} испитиваних једињења и поређењем са токсичношћу већ регистрованих лекова са структуром сукцинимида, може се закључити да посматрана серија сукцинимида показује пожељан низак степен токсичности и претпоставља се добар безбедносни профил.
- Ниједно од испитиваних једињења не делује цитотоксично на здраве фибробласте плућа. Највећи цитотоксични потенцијал у односу на третиране ћелијске линије хуманих карцинома показују једињења са метил и нитро супституентима у пара положају и дериват са бромом као супституентом у мета положају бензеновог прстена.
- Антипролиферативни ефекат једињења на ћелије хуманог карцинома дојке

<p>показује тенденцију пораста са смањењем енергије формирања комплекса са естроген рецептором алфа. Претпоставља се да се механизам деловања на ћелије карцинома дојке делимично може објаснити антихормонским ефектом оствареним преко естрогенних рецептора и препоручују се додатна истраживања на том пољу.</p>
<p>VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА</p> <p>Резултати истраживања докторске дисертације кандидата Јелене Турчић су јасно и прегледно приказани, табеларно и у виду графикона. Сваки табеларни и графички приказ резултата поткрепљен је детаљном дискусијом добијених резултата. Закључци су изведени коректно у складу са добијеним резултатима и дискусијом. Сходно томе, Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања.</p>
<p>IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:</p>
<p>Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:</p>
<p>1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме</p> <p>Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.</p>
<p>2. Да ли дисертација садржи све битне елементе</p> <p>Докторска дисертација садржи све неопходне елементе за разумевање обрађене теме и добијених резултата</p>
<p>3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци</p> <p>Имајући у виду широк спектар биолошких активности деривата сукцинимидида и експериментално потврђену цитотоксичну активност раније испитиваних Н-фенилсукцинимидида у односу на одређене ћелијске линије хуманих карцинома, постојала је оправдана потреба за идентификацијом оних молекула из новосинтетисане серије једињења који се издвајају по цитотоксичном потенцијалу. Оптимизација фармакокинетских и токсиколошких карактеристика кандидата за лек је од великог значаја не само за њихову будућу терапијску примену, већ и за сам процес развоја и испитивања. Велики научни допринос дисертације огледа се у селекцији оних деривата сукцинимидида за које се осим жељене антипролиферативне активности, на основу <i>in silico</i> предвиђених параметара, претпоставља добар фармакокинетски и безбедносни профил. Издвојена једињења се предлажу за даље фазе претклиничких и клиничких испитивања, у циљу развоја нових хемиотерапеутика побољшаних карактеристика.</p>

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Недостаци нису уочени у овој докторској дисертацији.
X ПРЕДЛОГ:
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
На основу позитивне оцене докторске дисертације Јелене Турчић, дипл.фарм, под називом „ <i>In silico</i> одређивање физичко-хемијских, фармакокинетских и токсиколошких параметара и <i>in vitro</i> испитивање антипролиферативне активности новосинтетисаних деривата Н-сукцинимида“, Комисија предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана овог рада.

датум: 23.01.2020.

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Председник
др Наташа Милић, редовни професор
Медицински факултет Нови Сад

Члан
др Весна Којић, научни сарадник
Медицински факултет Нови Сад

Члан
др Ивана Боришев, научни сарадник
Природно-математички факултет Нови Сад

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.