

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 14.04.2022., na osnovu člana 94. Statuta Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, doneta je odluka o imenovanju komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom: „Istraživanje antimikrobne aktivnosti i hromatografskog ponašanja sastojaka endofitnih gljiva primenom hemometrijskih metoda“ kandidata mag. farm. Janka Ignjatovića.

Izrada doktorske disertacije na predloženu temu je odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, koja je održana 20.04.2021.

Komisija u sastavu:

1. Dr Borut Štrukelj, redovni profesor, Univerzitet u Ljubljani – Farmaceutski fakultet, Republika Slovenija
2. Dr Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Republika Srbija
3. Dr Ana Protić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Republika Srbija
4. Dr Brankica Filipić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Republika Srbija.

je pročitala završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi sledeći Izveštaj.

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mag. farm. Janka Ignjatovića pod nazivom „**Istraživanje antimikrobne aktivnosti i hromatografskog ponašanja sastojaka endofitnih gljiva primenom hemometrijskih metoda**“ napisana je na 205 stranica, sadrži 26 slika i 34 tabele. Sastoji se od sledećih poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura, Prilozi, Biografija i Izjave autora doktorske disertacije.

Uvodni deo rada je napisan na 25 stranica i sastoji se iz 3 manje celine, odnosno potpoglavlja. U prvom potpoglavlju uvoda prezentovan je problem bakterijske rezistencije na postojeće lekove. Zatim je dat kratak pregled značaja endofitnih gljiva u razvoju antimikrobnih lekova. U narednom potpoglavlju uvoda su predstavljeni savremeni alati u razvoju lekova i metoda za njihovo ispitivanje sa osvrtom na: veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks* – ANN), pretraživanje velikih baza podataka (eng. *Data mining*); metode simulacije molekuskog povezivanja (eng. *Molecular docking study*); model kvantitativnog odnosa hemijske strukture, svojstva i aktivnosti; model kvantitativnog odnosa hemijske strukture i aktivnosti (eng. *Quantitative structure activity relationship studies*, QSAR); model kvantitativnog odnosa hemijske strukture i retencionog ponašanja molekule (eng. *Quantitative structure retention relationship*, QSRR), kao i značaj parametara lipofilnosti za biološku aktivnost; *in silico* metode za određivanje prediktora biološke aktivnosti novog leka i dizajn eksperimenata (eng. *Design of experiments*, DoE).

Poglavlje **Ciljevi** napisano je na jednoj stranici i u njemu je kratko sažeto sedam ciljeva doktorske disertacije. Prvi cilj podrazumevao je identifikaciju ključnih faktora koji ukazuju na potencijalnu antimikrobnu aktivnost endofitnih gljiva prema patogenim bakterijama primenom napredne analize podataka (eng. *Advanced Data Analytics*). Drugi cilj je obuhvatao procenu antimikrobne aktivnosti sekundarnih metabolita endofitnih gljiva *Phomopsis* spp. izolovanih iz četina četinara u Sloveniji, primenom bujon mikrodilucionog testa. Treći cilj je podrazumevao izolovanje i karakterizaciju hemijske strukture bioaktivnih molekula primenom separacionih (tankoslojna hromatografija, gasna hromatografija i tečna hromatografija pod visokim pritiskom) i spektroskopskih metoda (spektrofotometrija, masena spektrometrija, nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija). Četvrti cilj je obuhvatao primenu algoritama mašinskog učenja za razvoj i validaciju modela za opisivanje veze između hemijske strukture,

ponašanja u izabranim analitičkim sistemima i eksperimentalno izmerenog (*in vitro*) ili *in silico* procenjenog biološkog odgovora sekundarnih metabolita endofitnih gljiva. Peti cilj je podrazumevao predviđanje strukturnih karakteristika jedinjenja za ciljane vrednosti biološkog odgovora, kao i predviđanje ključnih fizičko-hemijskih parametra, lipofilnosti molekule i *pKa* vrednosti, kao prediktora biološke raspoloživosti nakon *in vivo* primene potencijalno novog leka. Šesti cilj je obuhvatao ispitivanje najverovatnijih mehanizama antimikrobnog delovanja biomolekula endofitnih gljiva na receptorima koji predstavljaju potvrđeno ciljno mesto delovanja do sada poznatih antimikrobnih lekova izvođenjem studija molekuskog *dokinga* i procenom mogućnosti za optimizaciju hemijske strukture i postizanje povoljnijeg antimikrobnog efekta. Sedmi cilj je obuhvatao analizu rezultata primene računarskih tehnika i upoređivanjem sa eksperimentalno dobijenim podacima.

Eksperimentalni deo je napisan na 27 stranica. Sadrži detalje svih metoda i pregled svih referentnih standardnih supstanci, rastvarača, reagenasa, uzoraka, opreme i računarskih programa koji su korišćeni u istraživanju. Detaljno su opisane procedure pripreme uzoraka za svaki segment izvođenja eksperimenata i dati su uslovi svake analize, kao i uslovi za izvođenje praktičnih eksperimenata iz domena tečne tankoslojne hromatografije (eng. *Thin-layer chromatography*, TLC), tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC), masene spektrometrije (eng. *Mass spectrometry*, MS) i nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije (eng. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR). Takođe su obuhvaćeni i *in silico* procena fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti komponenti ekstrakta endofitnih gljiva, *doking* simulacije i QSAR studije primenom pristupa baziranog na receptoru.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** je napisano na 62 stranice. Sadrži prikaz svih rezultata dobijenih sprovedenim eksperimentima i diskusiju o dobijenim rezultatima. Detaljan prikaz ovog poglavlja dat je u narednom delu izveštaja.

Poglavlje **Zaključak** je prikazano na 6 stranica. Sadrži sve zaključke u skladu sa postavljenim ciljevima doktorske disertacije.

Poglavlje **Literatura** je napisano na 22 stranice i sadrži 241 citiranu literaturnu referencu.

Poglavlje **Prilozi** sadrži dodatne materijale, listu skraćenica i simbola, spisak publikacija koje su obuhvaćene doktorskom disertacijom, dodatno obrazloženje i zahvalnicu.

U poglavlju **Biografija** data je kratka narativna biografija kandidata.

U poglavlju **Izjave autora doktorske disertacije** priložene su potpisane izjave o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada i izjava o korišćenju.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Prirodni proizvodi imaju izuzetan potencijal u razvoju i otkrivanju novih lekova u farmaceutskoj industriji. Godinama su naponi usmeravani na istraživanje terapijskog potencijala biljaka, međutim danas su endofitne gljive prepoznate kao novi podjednako dragocen prirodni izvor aktivnih molekula. Proizvodnja bioaktivnih sekundarnih metabolita endofitnih gljiva je pod uticajem širokog spektra faktora koji se odnose na tip biljnog domaćina, klimatske uslove, nutritivne faktore, prisustvo drugih mikroorganizama u istom okruženju, itd.

U okviru doktorske disertacije istaknuta je relevantnost pomenutih varijabilnosti kao i sličnosti ili različitosti u profilu antimikrobne aktivnosti endofitnih gljiva. Iako je analiza glavnih komponenti (eng. *Principal component analysis*, PCA) isključivo bila korišćena za prepoznavanje obrazaca u definisanom skupu podataka, detaljna analiza PCA ishoda i dijagrama otkrila je tri glavne grupe endofita među kojima učesnici prate slične i specifične trendove ispoljavanja bioaktivnosti. Ovo vredno saznanje može biti od pomoći u svim daljim istraživanjima endofitnih gljiva jer pruža pouzdano predznanje o antimikrobnom potencijalu endofitnih vrsta. Na osnovu rezultata PCA analize i rasprostranjenosti u PCA dijagramima, istaknut je veoma obećavajući antibakterijski potencijal vrsta *Phomopsis* kao i perspektiva te vrste endofita u terapijskoj upotrebi kao antifungalnih agenasa. Zaključeno je da je proizvodnja biomolekula *Phomopsis* endofitnih vrsta i njihov potencijal kao antimikrobnih agenasa obećavajući i relativno stabilan u uslovima koji su ispitivani, i da, stoga, biomolekule *Phomopsis* endofitnih vrsta imaju potvrđen neophodan preduslov za dalja farmaceutska istraživanja.

Izvršena je uspešna optimizacija hromatografskih uslova za primenu tankoslojne hromatografije za grupu od 3 analita koji potiču od različitih ekstrakata endofitne gljive *Phomopsis species*. U cilju optimizacije TLC metode upotrebljena je metodologija eksperimentalnog dizajna. Ova metodologija je takođe omogućila identifikaciju statistički značajnih eksperimentalnih faktora i njihovih međusobnih interakcija. Nakon preliminarnih ispitivanja, definisana su dva faktora, komponente mobilne faze, kao statistički značajni, pa su

posledično varirana u predloženom opsegu: udeo metanola (60 – 80 %, v/v) i udeo amonijum-hidroksida (4 – 6 %, v/v). Variranje faktora izvršeno je prema planu eksperimenata za Centralni kompozicioni dizajn. Hromatografska separacija je postignuta na TLC silika gel pločicama 60 RP-18 F254. Najviši udeo amonijum-hidroksida od 6 % (v/v) je identifikovan kao optimalan u procesu razdvajanja hromatografskih mrlja. Nasuprot tome, udeo metanola u ispitivanom opsegu nije pokazao značajniji uticaj. Najizraženiji afinitet za baznu hidrofilnu mobilnu fazu je pokazao analit 1, potom sledi analit 3, dok je najmanji afinitet za baznu hidrofilnu mobilnu fazu je pokazao analit 2. Osim uvida u obrasce hromatografskog ponašanja, zaključeno je da se predložena TLC metoda nakon postupka validacije, takođe, može koristiti za razdvajanje i analizu ekastrakata endofitnih gljiva kao i za određivanje sastava potencijalno biološki aktivnih sekundarnih metabolita.

U toku procesa razvoja lekova u ranoj fazi istraživanja se praktikuje određivanje i modulisanje fizičko-hemijskih parametara aktivnih molekula, među kojima lipofilnost pokazuje najbolju korelaciju sa biološkom raspoloživošću i aktivnošću. Lipofilnost jedinjenja se može iskazivati kroz niz izvedenih parametara, koji se mogu dobiti eksperimentalno ili pomoću različitih kompjuterskih programa i alata. Potvrđeno je da je reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (RP-TLC) praktična i efikasna metoda za razdvajanje analita, kao i za određivanje različitih deskriptora lipofilnosti na osnovu njihovog ponašanja u hromatografskom sistemu. Jedinjenjima sa potvrđenom antimikrobnom aktivnošću koja su izolovana iz endofita *Phomopsis* spp. i za koje je eksperimentalno potvrđena antimikrobna aktivnost, te su na osnovu toga prepoznata kao potencijalni novi lekovi, određeni su različiti parametri lipofilnosti nakon hromatografske analize. U ovim dodatnim eksperimentima baziranim na primeni RP-TLC metode, separacija analita iz ekstrakta endofita je postignuta TLC silika gel 60 RP-18 F254 pločama pri konstantnom zapreminskom udelu amonijum-hidroksida od 5 % (v/v) i različitim udelu metanola od 60 do 80 % (v/v) u mobilnoj fazi. Takođe, značaj modela za određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti i intenzitet tako definisanih vrednosti u odnosu na izmereni biološki odgovor, procenjen je u poređenju sa poznatim referentnim antibioticima (hloramfenikol, ciprofloksacin, ofloksacin i sulfacetamid-natrijum). Na osnovu vrednosti parametara R_M (hromatografski parameter lipofilnosti) i C_0 (udeo zapremine organskog rastvarača u mobilnoj fazi kada R_M ima vrednost jednaku nuli) zaključeno je da uzorak ekstrakta endofita koji sadrži jedinjenje 2 pokazuje niže parametre lipofilnosti u odnosu na uzorak endofita koji sadrži jedinjenje 1. U oba slučaja, parametri lipofilnosti su komparabilni sa lipofilnošću hloramfenikola i viši od ostalih ispitivanih

referentnih antibiotika (ofloksacina, ciprofloksacina i sulfacetamid natrijuma), pri čemu je parametar R_M^O (parameter lipofilnosti kada je udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi 0 %, v/v) nešto viši za jedinjenje 1 u odnosu na jedinjenje 2. Na osnovu poređenja specifičnih parametara lipofilnosti (R_f (retencioni factor analita u TLC sistemu), R_M i R_M^O), može se zaključiti da ispitivani analiti pokazuju visoke i komparabilne vrednosti lipofilnosti sa referentim antibioticima, što ukazuje na njihovu potencijalno visoku bioraspoloživost u organizmu.

Određen je antibakterijski potencijal endofitne gljive *Phomopsis species*, izolovane iz četina četinara, prema bakterijama *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Istraživana su dominantna jedinjenja koja su potencijalno odgovorna za antimikrobnu aktivnost. Na osnovu njihove antimikrobne aktivnosti i jedinstvenih strukturnih obeležja u poređenju sa već poznatim lekovima iz iste terapijske kategorije, okarakterisana su dva dominantna jedinjenja (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-3,4-dihidroksipent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat (označen kao jedinjenje 325-3) i (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-4-hidroksi-3-oksopent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat (označen kao jedinjenje 325-5). Takođe, na osnovu specifičnih svojstava, ovi biomolekuli bi mogli da služe kao vodeće strukture za buduće otkriće novih antibiotskih lekova. Evaluacija odnosa između hemijske strukture i intenziteta antibakterijske aktivnosti može da služi kao smernica za razvoj nove serije derivata i dalje poboljšanje njihove bioaktivnosti.

Istraživanje novih lekova i njihovo dizajniranje se zasniva na ispitivanju njihove biološke aktivnosti, ali je takođe važno generisati podatke o toksičnim i farmakokinetičkim osobinama leka. Sa stanovišta etike, postoji težnja da se podaci o toksičnim i farmakokinetičkim osobinama leka dobijaju upotrebom *in silico* metoda. Kao nastavak istraživanja aktivnosti sekundarnih metabolita endofitne gljive *Phomopsis species* poreklom iz četine četinara, na teritoriji Slovenije izvršena je *in silico* procena toksikoloških i farmakokinetičkih parametara. Glavni faktor za procenu lipofilnosti $\log P$ (logaritam podeonog koeficijenta) sekundarnih metabolita sa potvrđenom aktivnošću protiv Gram negativnih (*Escherichia coli*) i Gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus*) bakterija izračunat je korišćenjem programa *MarvinSketch 4.1.13*. Dodatno su vrednosti *in silico* deskriptora prema pravilu Lipinskog, kao i prema pravilu Ghose izračunati primenom programa *SwissADME*. Volumen distribucije, Veber-ovo pravilo, toksikološki parametri kao i procenat vezivanja jedinjenja za proteine plazme su izračunati upotrebom softverskog paketa *ACD/i-lab*. Na osnovu dobijenih rezultata je potvrđeno da aktivne molekule izolovane iz ekstrakta endofitnih gljiva ispunjavaju kriterijume

definisane pravilom Lipinskog. Zato se može zaključiti da se ispitivani aktivni sekundarni metaboliti iz ekstrakta *Phomopsis species* mogu dobro apsorbirati kroz intestinalnu sluznicu, pošto dobijene niske vrednosti ukazuju na mogućnost brze apsorpcije. Dobijene su srednje vrednosti za volumen distribucije aktivnih jedinjenja, te se može pretpostaviti da ispitivana jedinjenja nemaju tendenciju da se akumuliraju u masnom tkivu pacijenta. Na osnovu navedenog se može zaključiti da ispitivana jedinjenja iz ekstrakta *Phomopsis species*, koji su takođe potencijalni kandidati za lek, imaju srednji afinitet vezivanja za proteine plazme. Dodatno je primećeno da se toksičnost ispitivanih jedinjenja ne razlikuje znatno u poređenju sa referentnim antibioticima koji su bili ispitivani kao standardna kontrola.

Kao nastavak *in vitro* eksperimenata za antimikrobnu procenu, razdvajanje i karakterizaciju biomolekula endofitnih gljiva, predložen je *in silico* molekularni *docking* sa ciljem pouzdanog prepoznavanja aktivnih struktura i vodećih molekula za otkriće novih antibiotika. U okviru ovog istraživanja, ispitivane su interakcije između seta od dvanaest jedinjenja i njihovih potencijalnih ciljanih receptora. Prema kriterijumima za ocenjivanje *docking* simulacija koji su uključivali vrednost slobodne energije vezivanja, konstante inhibicije, *RMSD* (kvadratni koren srednje standardne devijacije) vrednosti i potencijala za uspostavljanje vodoničnih veza sa receptorom, zaključeno je da je najveći potencijal za *docking* interakciju zapažen u slučaju 3G7B, 1F0K i 1SHV receptora lociranih na patogenima *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Rezultati iz ovog *docking* istraživanja sugerišu da strukturne sličnosti kao i neka specifična svojstva jedinjenja 325-3, 325-5, fomoenamida i fomola se u budućnosti mogu koristiti kao smernice za dalji razvoj njihovih derivata kao novih antibiotika sa snažnim delovanjem širokog spektra. Osim toga, ova otkrića mogu ukazati na to kako izvršiti dalju optimizaciju proizvodnje biomolekula iz endofitnih gljiva i/ili efikasniju obradu prikupljenog biomaterijala. Pored toga, ispitivana jedinjenja bi mogla da ispoljavaju i drugačije mehanizme delovanja i interaguju i sa drugim receptorima.

Rezultati izvedenih studija molekulskog *docking*-a ukazali su na najvažnije interakcije između izabranih liganada i receptora. Na osnovu poređenja rezultata dobijenih za bioaktivne molekule poreklom iz endofitnih gljiva sa rezultatima dobijenim nakon *docking* eksperimenata sa poznatim antimikrobnim agensima (referentnim antibioticima), može se ukazati na potencijal biomolekula da ostvare željeno delovanje u *in vitro* ili *in vivo* uslovima. Direktnom analizom vrednosti energije vezivanja koja se javlja u toku interakcije između liganda i receptora, može se proceniti terapijska efikasnost potencijalno novog leka, kao i najverovatniji mehanizam antimikrobnog delovanja. Međutim, kako bi značaj rezultata

docking studija dobio dodatno na svom značaju, nagrađeni su QSAR modeli primenom pristupa baziranom na receptoru sa ciljem pouzdanog predviđanja afiniteta vezivanja biomolekula za određeni tip receptora. Iz sprovedenih *docking* studija na 3 reprezentativna receptora (1F0K – 1,9 Å transferaza *Escherichiae coli*, 3G7B – *Staphylococcus aureus* giraza B i 1SHV – β-laktamaza *Klebsiella pneumoniae*). U svim ANN-QSAR modelima, niske vrednosti greške za trening i validacioni set podataka, vrednosti koeficijenta korelacije što bliže 1 i niska vrednost greške za test set podataka, ukazuju na to da nagrađeni ANN-QSAR modeli imaju dobru sposobnost predviđanja. Stoga svi nagrađeni modeli mogu poslužiti za predviđanje bioaktivnosti serije strukturno srodnih biomolekulima iz korišćenog seta podataka, a koji potencijalno mogu nastati usled prirodnih varijacija u uslovima okruženja u kojima se endofitna gljiva razvija i/ili kultiviše, kao i optimizacijom strukture putem sinteze derivata poznatih biomolekula.

C. UPOREDNA ANALIZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

U okviru poglavlja Rezultati i diskusija, dobijeni rezultati istraživanja su detaljno analizirani i razmatrani u kontekstu dostupnih literaturnih podataka.

Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije, bakterijska rezistencija na antibiotike je u porastu u svim delovima sveta i predstavlja jednu od najvećih pretnji globalnom zdravlju [1-3]. Bakterije razvijaju nove mehanizme otpornosti na postojeće antimikrobne agense, što predstavlja pretnju da ustaljeni načini lečenja zaraznih bolesti postanu neefikasni. Iako se otpornost na antibiotike kod bakterija javlja prirodno, neracionalna primena antibiotika kod ljudi i životinja ubrzava proces razvoja rezistencije [4-6]. Rastuća lista zaraznih bolesti, poput pneumonije, bolesti urinarnog sistema, tuberkuloze, gonoreje i bolesti uzrokovanih mikroorganizmima prisutnim u hrani, postaje sve veća, a ponekad je i nemoguće sprovesti lečenje jer antibiotici postaju sve manje efikasni [7, 8]. Otpornost na antibiotike dovodi do dužeg boravka pacijenata u bolnici, većih medicinskih troškova i povećanja smrtnosti [9, 10]. Prema podacima Evropske agencije za prevenciju i kontrolu bolesti, otpornost sojeva bakterija *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. je u porastu, s obzirom da su testirani izolati bakterija bili otporni na najmanje jednu antimikrobnu grupu lekova, a primećena je i kombinovana rezistencija na nekoliko grupa antimikrobnih lekova [11]. Zbog

navedenog problema bakterijske rezisitencije, sve više naučnih istraživanja je usmereno ka otkrivanju novih potentnijih antimikrobnih lekova. Svojim sadržajem, ova doktorska disertacija predstavlja svojevrsan doprinos na ovom polju istraživanja. Inače, imajući u vidu dinamiku razvoja bakterijske rezisitencije, ovakva istraživanja su obično podržana novim strategijama ubrzanog razvoja lekova zasnovanim na računarskim metodama, što je takođe sastavni deo metodološkog pristupa ove doktorske disertacije.

Poznato je da su biljke tokom evolucije razvile određene sposobnosti, kao što je produkcija sekundarnih metabolita, u cilju odbrane od patogenih mikroorganizama, insekata ili drugih životinja koje se njima hrane [12]. Pored toga, utvrđeno je da su u brojnim biljnim tkivim prisutni mikroorganizmi koji u njima rastu i razmnožavaju se [13-15]. U literaturi se pod terminom endofitizam označava ova jedinstvena i uzajamna asocijacija biljaka i mikroorganizama [16]. Stoga se mikroorganizmi koji žive u tkivima biljaka definišu kao endofiti [17-18], a pripadaju grupi bakterija i gljiva [19]. Obično je za svakog domaćina specifičan jedan endofit koji je karakterističan za uslove i geografsku oblast u kojoj se biljka domaćin razvija [20-23]. U izbalansiranoj međusobnoj vezi, da bi doprineli opstanku biljke domaćina, endofiti proizvode sekundarne metabolite pomažući tako domaćinu da savlada invaziju patogenih mikroorganizama [24-30]. Važno je napomenuti da se do nedavno traganje za novim bioaktivnim proizvodima endofita zasnivalo uglavnom na nasumičnom ispitivanju izolata. Radi optimizacije traganja za novim bioaktivnim sekundarnim metabolitima, važno je uzeti u obzir da sekundarni metaboliti koje endofiti sintetišu mogu korespondirati sa odgovarajućom ekološkom nišom endofita, kao i da metaboličke interakcije mogu da pospeše sintezu određenih sekundarnih metabolita [31-33]. Iz tog razloga je uvodni deo ove doktorske disertacije obuhvatio primenu metoda označenih kao napredna analiza podataka (eng. *Advanced data analytics*), sa ciljem da se sadržajno i sveobuhvatno ispituju sve okolnosti pod kojima se obezbeđuje optimalan rast i razvoj endofitnih gljiva, kao i produkcija bioaktivnih sekundarnih metabolita. Na osnovu dostupne literature, ovakav pristup istraživanju biloškog potencijala ispitivanih organizama do sada nije primenjivan.

Vežano za aktuelnost i inovativnost predmeta istraživanja doktorske disertacije, potrebno je naglasiti da ova grupa organizama nije ekstenzivno proučavana kao, na primer, biljni patogeni, što znači da je manje verovatno da su izolovani metaboliti poznate strukture, odnosno opisani u dostupnoj naučnoj literaturi. Sa druge strane, metaboličke interakcije endofita sa biljkom domaćinom mogu ići na ruku sintezi biološki aktivnih sekundarnih

metabolita [34-35] koji opet mogu imati direktnu ili indirektnu primenu u terapiji brojnih bolesti [36-38]. Do danas, otkriveni su endofiti koji proizvode sekundarne metabolite sa priznatim terapijskim potencijalom, kao što je paklitaksel [39], podofilotoksin [40], deokspodofilotoksin [41], kamptotecin [42], hipericin i emodin [43], itd. Podaci iz pretražene literature naglašavaju veoma značajnu antibakterijsku i antimikotičnu aktivnost endofitnih gljiva koje pripadaju *Phomopsis* vrstama [44-52]. Rakshith et al. navode da je rod *Phomopsis* poznat kao bogat izvor bioaktivnih sekundarnih metabolita nove raznolike strukture i funkcije kao što su fomopsihalasin, citochalasin, konvolvulanska kiselina, izobenzofuranoni, oblongolid, fomopsolid, fomodiol, fomoksantoni i dimeri ksantona, fomoenamid, fomonitroestar, deacetilfomoksanton B, dicerandrol A, (1S,2S,4S)-p-mentan-1,2,4-triol, uridin, etil-2,4- dihidroksi-5,6-dimetilbenzoat i fomopscilacton. Te strukture su dodatno ispitivane i pokazale su antibakterijsku, antifungalnu i antialgalnu aktivnost [50].

Imajući u vidu sva gore navedena aktuelna saznanja iz oblasti terapije mikrobnih infekcija, prvi deo naučnog istraživanja doktorske disertacije bavio se identifikacijom i klasifikacijom pokazatelja antimikrobne aktivnosti ekstrakata endofitnih gljiva primenom savremenih računarskih tehnika za naprednu analizu podataka. Za odabrane predstavnike endofitnih gljiva sa najpovoljnijim biološkim svojstvima, vršilo se izolovanje i karakterizacija hemijskih struktura biomolekula primenom separacionih i spektroskopskih metoda i *in vitro* procena aktivnosti. Ovo je rezultovalo otkrićem potpuno novih hemijskih struktura (novih hemijskih entiteta) i dodatno nepoznatih u grupi antimikrobnih agenasa sa do sada definisanom terapijskom primenom.

Opšte je poznata činjenica da su otkrivanje i razvoj lekova procesi koji zahtevaju mnogo vremena i resursa. Zbog te činjenice, prepoznat je veliki potencijal u primeni računarskih alata u kombinovanom hemijskom i biološkom prostoru kako bi se pojednostavilo otkrivanje, dizajn, razvoj i optimizacija lekova. U poslednje vreme, veliko interesovanje vlada za primenu savremenih tehnika za naprednu analizu podataka koje omogućavaju istraživanje velikih skupova podataka sa ciljem otkrivanja složenih odnosa, međusobne povezanosti informacija, odnosno za otkrivanja smislenih obrazaca ponašanja unutar velike grupe podataka. Ovakve tehnike se u literaturnim izvorima na engleskom jeziku označavaju imenom *data mining*, a obuhvataju grupisanje / klasterovanje, klasifikaciju, regresiju i pravila asocijacije [53-54]. U literaturi je potvrđena uspešna primena analize glavnih komponenata (eng. *Principal component analysis*, PCA) za istraživanje velikih baza bioaktivnih jedinjenja kako bi se ubrzalo i olakšalo identifikovanje potencijalno novih

terapijskih agenasa. Često korišćeni računski pristupi uključuju dizajn lekova koji se zasniva na ligandima (dizajn farmakofora, 3D prostorni raspored hemijskih karakteristika neophodnih za biološku aktivnost), dizajnu leka na bazi strukture (interakcija lek-ciljno mesto delovanja), kvantitativnom odnosu između strukture i retencionog ponašanja (eng. *Quantitative Structure Retention Relationship*, QSRR), kvantitativnom odnosu između strukture i aktivnosti (eng. *Quantitative structure-activity relationship*, QSAR), i konačno kvantitativnom odnosu strukture i različitih svojstava jedinjenja (eng. *Quantitative Structure Property Relationships*, QSPR) [55-59].

In silico metodama je moguće izvršiti izbor najboljih mogućih kandidata za lek radi dalje obrade i proveravanja specifičnih svojstava [60-61]. U tom cilju se u ranim fazama istraživanja koristi fizičko-hemijski pregled (eng. *scrining*) kako bi se omogućilo sveobuhvatnije razumevanje ključnih svojstava koja utiču na biološku dispoziciju obećavajućih struktura kao što su: apsorpcija u gastrointestinalnom traktu, propusnost krvno-moždane barijere, distribucija u sistemske cirkulaciji i tkivima, metabolizam, izlučivanje, kao i vezivanje za protein plazme, interakcije sa receptorima i toksičnost potencijalnog leka [62-65]. Određivanje parametara lipofilnosti ($\log P$ i $\log D$) je stoga od primarne važnosti, jer omogućava eliminaciju onih strukturalnih kandidata za koje je malo verovatno da će postati lekovi zbog loših farmakokinetičkih svojstava [66-68]. U praksi su eksperimenti određivanja ovih parametara dugotrajni i finansijski zahtevni i često podrazumevaju određivanje biorasploživosti na životinjama *in vivo*. Međutim, dokazano je da retencioni deskriptori jedinjenja dobijeni HPLC ili TLC analizom dobro koreliraju sa parametrima lipofilnosti za ta ista jedinjenja [69-75]. U praksi su ovakva *in silico* ispitivanja obično preduslov za dalja *in vivo* istraživanja, a velika prednost njihove upotrebe je svakako vezana i za izbegavanje problema povezanih sa bezbednošću samih eksperimentalnih procedura.

Dodatno, sa ciljem pravilnog razumevanja svojstava jedinjenja i tumačenja dobijenih rezultata, ključna je uloga još jednog hemometrijskog pristupa koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji, a to je dizajn eksperimenata (eng. *Design of Experiments*, DoE). Njegova primena podrazumeva sistematično planiranje i izvođenje eksperimenata koje obezbeđuje racionalizaciju eksperimentalnog rada. DoE metodologija omogućava dobijanje matematičkih modela, odnosno veza koje postoje između zavisno i nezavisno promenljivih određenog hemijskog (hromatografskog) sistema. Multifaktorski pristup koji je ovde prisutan predstavlja dragoceni način sprovođenja eksperimenata, jer se veliki broj nezavisno promenljivih može istovremeno varirati bez opasnosti od pogrešnog tumačenja njihovih

pojedinačnih doprinosa i dovode do ispravnog predviđanja ciljanog ponašanja sistema [76-82]. Međutim, za postizanje navedenih rezultata potrebni su pouzdani i sofisticirani alati za analizu podataka poput tzv. mašinskog učenja (eng. *machine learning* - ML) [83-86]. Iako je danas poznata upotreba brojnih algoritama mašinskog učenja, najčešće se u farmaceutskim istraživanjima koriste veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial neural networks*, ANN) osmišljene tako da oponašaju veze između neurona mozga i primenjuju supervizirano učenje zasnovano na prethodno naučenom iskustvu, odnosno obrascima preuzetim iz prethodno prikazanih skupova podataka [87-90].

Još jedna od *in silico* tehnika koje se koriste za istraživanje bioaktivnosti je simulacija povezivanja (eng. *docking simulations*) odabranih receptora i molekulskih struktura. U osnovi, molekularni doking podrazumeva računarsku *in silico* proceduru traženja odgovarajućeg liganda koji energetski i geometrijski odgovara poznatom mestu vezivanja na ciljnom receptoru. Takođe, *in silico* doking simulacija omogućava predviđanje energetski stabilne orijentacije fleksibilnog molekula (ligand) u odnosu na rigidnu strukturu receptora i potencijalno formiranje kompleksa između liganda i receptora. Zbog mogućnosti predviđanja potencijalne interakcije liganda i receptora, molekularni *docking* je jedna od najčešće korišćenih metoda u računarskom dizajniranju lekova [91-93].

Zbog svega nevedenog, nakon početnog doktazivanja postojanja odgovarajućeg intenziteta biološke aktivnosti tokom *in vitro* eksperimenata, kao i izolovanja i karakterizacije strukture jedinjenja odgovornih za uočenu aktivnost, u ostatku naučnog istraživanja doktorske disertacije, fokus je bio na primeni odabranih hemometrijskih alata u ispitivanju veze između hemijske strukture, ponašanja u izabranim analitičkim TLC i HPLC sistemima, i eksperimentalno izmerenog ili *in silico* procenjenog biološkog odgovora biomolekula endofitnih gljiva (stepen antimikrobne aktivnosti i vrednosti tzv. prediktora biološke aktivnosti u *in vivo* sistemima među kojima su lipofilni karakter i kiselo-bazne osobine molekula). Navedene relacije su se opisale putem matematičko-statističkih modela dobijenih primenom računarskih metoda koji su se oslanjali na algoritme mašinskog učenja, odnosno modela koji predstavljaju krajnji rezultat izvedenih QSR(A)R studija (eng. *Quantitative Structure-Retention (Activity) Relationships*). Analizom razvijenih i validiranih modela, za ciljne vrednosti biološkog odgovora, izvršilo se predviđanje strukturnih karakteristika odgovarajućih jedinjenja potencijalnih kandidata za nove lekove. Izvođenjem studija molekuskog *docking*-a, bio je ispitan potencijalni mehanizam antimikrobnog delovanja biomolekula endofitnih gljiva na receptorima koji predstavljaju potvrđeno ciljno

mesto delovanja do sada poznatih antimikrobnih lekova, a na osnovu opisane interakcije sa receptorima, procenjena je mogućnost za optimizaciju hemijske strukture i postizanje povoljnijeg antimikrobnog efekta, odnosno optimizacija uslova za kultivisanje i obradu biomase endofitnih gljiva. Na ovaj način, obezbeđeno je suštinsko razumevanje izvora bioaktivnosti endofitnih gljiva, kao i mehanizma kojim se on ostvaruje. Doprinos nagrađenih matematičko-statističkih modela sa visokom prediktivnom moći je da obezbedi dovoljno informacija za buduća naučno zasnovana sistematična i racionalna istraživanja antimikrobnog delovanja sekundarnih metabolita endofitnih gljiva bazirana na optimizaciji uslova za kultivisanje ovih organizama, izbor nutrijenata, uslova za izolovanje i sekundarnih metabolita i slično što može rezultovati dobijanjem široke palete hemijski srodnih jedinjenja.

Iz svega navedenog, jasno je da su sve hipoteze i teorijska osnova istraživanja koje predstavlja sastavni deo ove doktorske disertacije postavljene su na osnovu opsežnog kritičkog pregleda dostupne literature. Konačno, može se zaključiti da su primenom odgovarajućih teorijskih, eksperimentalnih, *in vitro* i računarskih *in silico* hemometrijskih metoda dobijeni rezultati čiji se značaj ogleda u metodološki savremenom naučnom doprinosu ispitivanju antimikrobnog potencijala biomolekula endofitnih gljiva, sa posebnim osvrtom na studiju bioaktivnosti *Phomopsis species*. Osim savremenog metodološkog pristupa, sve saznanja koja predstavljaju rezultat ove disertacije, predstavljaju značan iskorak u rešavanju problema bakterijske rezistencije jer, osim ukazivanja na potpuno nova jedinjenja koja predstavljaju dobre kandidate za razvoj novih lekova, bacaju svetlost na ogroman prostor za buduća farmaceutska istraživanja i razvoj novih lekova baziran na prirodnim i obnovljivim izvorima.

Reference:

1. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*.2010; 8(4): 260-271.
2. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014; 6: 25-64
3. Soares GMS, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte, PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of applied oral science*. 2012; 20(3): 295-309.
4. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification.

- Advanced drug delivery reviews. 2005;57(10): 1451-1470.
5. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*.2005; 57(10): 1486-1513.
 6. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(1): 35-48.
 7. Lew W, Pai M, Oxlade O, Martin D, Menzies D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 2008; 149: 123–134.
 8. Guay DR. Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs*. 2008; 68: 1169–1205.
 9. Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, Mohr JF. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2017; 37(1): 71-84.
 10. Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clinical microbiology and infection*. 2014; 20(10): 973-980.
 11. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. European agency for disease control and prevention. 2018; 1-110.
 12. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*.2003; 64(1): 3-19.
 13. Nisa H, Kamili AN, Nawchoo IA, Shafi S, Shameem N, Bandh SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microbial pathogenesis*. 2015; 82: 50-59.
 14. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*. 2002;106(9): 996-1004.
 15. Udayanga D, Liu X, McKenzie EH, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal diversity*. 2011; 50(1): 189-225.
 16. Kusari S, Spiteller M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*. 2012; 241-266.
 17. Kusari S, Hertweck C. Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of

- secondary metabolites. *Chemistry & biology*. 2012; 19(7): 792-798.
18. Bacon CW, White J. *Microbial endophytes*. CRC press. 2000.
 19. Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*. 2008; 3(2): 75-93.
 20. Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(26): 15649-15654.
 21. Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*. 2008; 278(1): 1-9.
 22. Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*. 2001; 18(4): 448-459.
 23. Deng Z, Cao L. Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review. *Chemosphere*. 2017; 168:1100-1106.
 24. Hussain H, Tchimine MK, Ahmed I, Meier K, Steinert M, Draeger S, Schulz B, Krohn K. Antimicrobial chemical constituents from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Notobasis syriaca*. *Nat. product commun*. 2011; 6(12): 1905-1906.
 25. Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, Danwisetkanjana K, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of Natural Products*. 2001; 64(8): 1015-1018.
 26. Rakshith D, Santosh P, Satish S. Isolation and characterization of antimicrobial metabolite producing endophytic *Phomopsis* sp. from *Ficus pumila* Linn.(Moraceae). *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 2013; 4(3): 156-160.
 27. Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, & Barka EA. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71(4): 1685-1693.
 28. Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of invertebrate pathology*. 2008; 98(3): 267-270.
 29. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*. 2006; 19(8): 827-837.
 30. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. opinion in plant biology*. 2011; 14(4): 435-443.

31. Mousa WK, Raizada MN. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in microbiology*. 2013; 4(65): 1-18.
32. Kusari S, Spiteller M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural product reports*. 2011; 28(7): 1203-1207.
33. Ludwig-Müller J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology letters*. 2015; 37(7): 1325-1334.
34. Venugopalan A, Srivastava S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*. 2015; 33(6): 873-887.
35. Kusari S, Pandey SP, Spiteller M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry*. 2013; 91: 81-87.
36. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*. 2010; 41(1): 1-16.
37. Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural product reports*. 2010; 28(7): 1208-1228.
38. Radić N, Štrukelj B. Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*. 2012; 19(14): 1270-1284.
39. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 1993; 260(5105): 214-216.
40. Eyberger AL, Dondapati R, Porter JR. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of natural products*. 2006; 69(8): 1121-1124.
41. Kusari S, Lamshöft M, Spiteller M. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J. appl. microbial*. 2009; 107(3): 1019-1030.
42. Puri SC, Verma V, Amna T, Qazi GN, Spiteller M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. *Journal of natural products*. 2005; 68(12): 1717-1719.
43. Kusari S, Lamshöft M, Zühlke S, Spiteller M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products*. 2008; 71(2): 159-162.

44. Rukachaisirikul V, Sommart U, Phongpaichit S, Sakayaro, J, Kirtikara K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*. 2008; 69(3): 783-787.
45. Huang Z, Cai X, Shao C, She Z, Xia X, Chen Y, Yang J, Zhou S, Lin Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*. 2008; 69(7): 1604-1608.
46. Mostert L, Crous PW, Kang JC, Phillips AJ. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*. 2001; 93(1): 146-167.
47. Diogo EL, Santos JM, Phillips AJ. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*. 2010; 44(1): 107-115.
48. Farr DF, Castlebury LA, Rossman AY. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia*. 2002; 94(3): 494-504.
49. Rakshith D, Santosh P, Satish S. Isolation and characterization of antimicrobial metabolite producing endophytic *Phomopsis* sp. from *Ficus pumila* Linn (Moraceae). *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 2013; 4(3): 156-160.
50. Hussain H, Tchimine MK, Ahmed I, Meier K, Steinert M, Draeger S, Schulz B, Krohn K. Antimicrobial chemical constituents from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Notobasis syriaca*. *Nat. Prod. Commun*. 2011; 6(12): 1905-1906.
51. Mostert L, Crous PW, Kang JC, Phillips AJ. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*. 2001; 93(1): 146-167.
52. Farr DF, Castlebury LA, Rossman AY. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia*. 2002; 94(3):494-504.
53. Romero C, Ventura S. (2010). Educational data mining: a review of the state of the art. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part C (Applications and Reviews)*. 2010; 40(6): 601-618.
54. Lo YC, Rensi SE, Torng W, Altman RB. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug discovery today*. 2018; 23(8): 1538-1546.
55. Kapetanovic, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADDD): in silico-chemico-biological approach. *Chemico-biological interactions*. 2008; 171(2), 165-

176.

56. Augen, J. The evolving role of information technology in the drug discovery process. *Drug discov. today*. 2002; 7(5): 315-323.
57. Kumar, N., Hendriks, B. S., Janes, K. A., de Graaf, D., Lauffenburger, D. A. Applying computational modeling to drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006; 11(17-18), 806-811.
58. Ivanov, S. M., Lagunin, A. A., & Poroikov, V. V. In silico assessment of adverse drug reactions and associated mechanisms. *Drug Discovery Today*. 2016; 21(1), 58-71.
59. Loging, W., Harland, L., & Williams-Jones, B. (2007). High-throughput electronic biology: mining information for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2007; 6(3): 220-230.
60. Rifaioglu AS, Atas H, Martin MJ, Cetin-Atalay R, Atalay V, Doğan T. Recent applications of deep learning and machine intelligence on in silico drug discovery: methods, tools and databases. *Briefings in bioinformatics*. 2019; 20(5): 1878-1912.
61. Terstappen G C, Reggiani A. In silico research in drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*. 2001; 22(1): 23-26.
62. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *British journal of pharmacology*. 2007; 152(1): 21-37.
63. Yu H, Adedoyin A. ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug discovery today*. 2003; 8(18): 852-861.
64. Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, Liu X, Luo X, Luo C, Chen K, Zheng M, Jiang H. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly reviews of biophysics*. 2015; 48(4): 488-515.
65. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2017; 13(11): 1147-1158.
66. Andrić F, Héberger K. Towards better understanding of lipophilicity: Assessment of in silico and chromatographic logP measures for pharmaceutically important compounds by nonparametric rankings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015; 115: 183-191.
67. Young RJ, Green DV, Luscombe CN, Hill AP. Getting physical in drug discovery II: the impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity. *Drug discovery today*. 2011; 16(17-18): 822-830.
68. Elder D, Holm R. Aqueous solubility: simple predictive methods (in silico, in vitro and

- bio-relevant approaches). *International journal of pharmaceutics*. 2013; 453(1): 3-11.
69. Kujawski J, Popielarska H, Myka A, Drabińska B, Bernard, MK. The log P parameter as a molecular descriptor in the computer-aided drug design—an overview. *Comput. Methods Sci. Technol*. 2012; 18(2): 81-88.
 70. Waring MJ. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2010; 5(3): 235-248.
 71. Balogh GT, Tarcsay Á, Keserű GM. Comparative evaluation of pKa prediction tools on a drug discovery dataset. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012; 67: 63-70.
 72. Dardonville C. Automated techniques in pKa determination: low, medium and high-throughput screening methods. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2018; 27: 49-58.
 73. Manallack DT, Prankerd RJ, Yuriev E, Oprea TI, Chalmers DK. The significance of acid/base properties in drug discovery. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(2): 485-496.
 74. Arnott JA, Planey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery*. 2012;7(10): 863-875.
 75. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2017; 13(11): 1147-1158.
 76. Gad HA., El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, Al-Azizi MM. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis*. 2013; 24(1): 1-24.
 77. Deming SN. Chemometrics: an overview. *Clinical chemistry*. 1986; 32(9): 1702-1706.
 78. Leardi R. Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: a review. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*. 2001; 15(7): 559-569.
 79. Brereton RG. *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons; 2003 July 25.
 80. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. *Chemometrics: a practical guide*. New York: Wiley; 1998 Mar 31.
 81. Massart DL, Vandeginste BG, Buydens LM, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J, Jong SD. *Handbook of chemometrics and quality metrics*. Elsevier Science Inc.; 1998 Oct 1.
 82. Hanrahan G, Gomez FA, editors. *Chemometric methods in capillary electrophoresis*. John Wiley & Sons; 2009 Oct 22.
 83. Lo YC, Rensi SE, Torng W, Altman RB. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug discovery today*. 2018; 23(8): 1538-1546.

84. Zhang L, Tan J, Han D, Zhu H. From machine learning to deep learning: progress in machine intelligence for rational drug discovery. *Drug discovery today*. 2017; 22(11): 1680-1685.
85. Wale N. Machine learning in drug discovery and development. *Drug Development Research*. 2011; 72(1): 112-119.
86. Wale N. Machine learning in drug discovery and development. *Drug Development Research*. 2011; 72(1): 112-119.
87. Zhang L, Tan J, Han D, Zhu, H. From machine learning to deep learning: progress in machine intelligence for rational drug discovery. *Drug discovery today*. 2017; 22(11): 1680-1685.
88. Pantelev J, Gao H, Jia L. Recent applications of machine learning in medicinal chemistry. *Bioorg. Medicin. Chem. letters*. 2018; 28(17): 2807-2815.
89. Sato T, Honma T, Yokoyama S. Combining machine learning and pharmacophore-based interaction fingerprint for in silicoscreening. *Journal of chemical information and modeling*. 2010; 50(1): 170-185.
90. Ekins S, Puhl AC, Zorn KM, Lan TR, Russo DP, Klein JJ, Hickey AJ, Clark AM. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development. *Nature materials*. 2019; 18(5): 435-441.
91. Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecularstructure*. 2003; 32(1): 335-373.
92. Huang N, Shoichet BK, Irwin JJ. Benchmarking sets for molecular docking. *J. Medicin. Chem*. 2006; 49(23): 6789-6801.
93. Shoichet BK, McGovern SL, Wei B, Irwin JJ. Lead discovery using molecular docking. *Current opinion in chemical biology*. 2002; 6(4): 439-446.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak objavljenih naučnih radova u međunarodnim časopisima:

- 1) **Ignjatović J**, Đajić N, Krmar J, Protić A, Štrukelj B, Otašević B. Molecular docking study on biomolecules isolated from endophytic fungi. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2021; 86(2): 125-137.
doi: <https://doi.org/10.2298/JSC200815002I>
Naziv časopisa: Journal of the Serbian Chemical Society
Impakt faktor (2020): 1,240
Kategorija: časopis rangiran u kategoriji **M23**
Rang časopisa u oblasti Chemistry, Multidisciplinary: 141/178
- 2) **Ignjatović J**, Maljurić N, Golubović J, Ravnikar M, Petković M, Savodnik N, Štrukelj B, Otašević B. Characterization of Biomolecules with Antibiotic Activity from Endophytic Fungi *Phomopsis species*. *Acta Chimica Slovenica*. 2020; 67(2): 445-461.
doi: <http://dx.doi.org/10.17344/acsi.2019.5389>
Naziv časopisa: Acta Chimica Slovenica
Impakt faktor (2020): 1,735
Kategorija: časopis rangiran u kategoriji **M23**
Rang časopisa u oblasti Chemistry, Multidisciplinary: 127/178

Spisak objavljenih naučnih radova u naučnim časopisima od nacionalnog značaja:

- 1) Otašević B, Krmar J, Đajić N, **Ignjatović J**, Protić A. Chemometric window to antimicrobial activity of biomolecules isolated from endophytic fungi. *Archives of Pharmacy*. 2020; 70: 142-156.
doi: <https://doi.org/10.5937/arch%20of%20pharm70-26297>
Naziv časopisa: Archives of Pharmacy
Impakt faktor (2020): 0,02
Kategorija: časopis rangiran u kategoriji **M52**
Rang časopisa u oblasti Pharmaceutical science: 151/166

Spisak radova saopštenih na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu ili u celosti:

- 1) Otašević B, **Ignjatović J**, Maljurić N, Krmar J, Zečević M. Chemometric Approach in Bioactivity Profiling – The Case of Biomolecules from Endophytic Fungi. *Proceedings (Book of abstracts) of the 7th annual conference of AnalytiX-2019; 2019 Nov 13-15; Berlin, Germany. (kategorija M32)*

- 2) **Ignjatović J**, Maljurić N, Golubović J, Petković M, Ravnikar M, Štrukelj B, Otašević B. Characterization of biomolecules with antibiotic activity from endophyte *Phomopsis species*. Proceedings (Book of abstracts) of the VII international pharmacy congress; 2018 Oct 10-14; Belgrade, Serbia. (kategorija **M64**)
- 3) Otašević B, Protić A, Golubović J, **Ignjatović J**, Zečević M. The Potential of Quantitative Structure-Retention-(Biological) Activity Relationship (QRAR) Investigations in Pharmaceutical Research. Proceedings (Book of abstracts) of the Euro chemistry International Conference; 2016 Jun 16-18; Rome, Italy. (kategorija **M34**)
- 4) **Ignjatović J**, Otašević B, Zečević M, Protić A, Golubović J. The use of green methodologies in drug analysis based on high performance liquid chromatographic methods. Proceedings (Book of abstracts) of the 21st International Symposium on Separation Sciences of the National Institute of Chemistry; 2015 Jun 30–Jul 3; Ljubljana, Slovenia. (kategorija **M34**)

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezistencija bakterija na delovanje antibiotika predstavlja globalni problem. Na polju razvoja novih lekova iz prirodnih izvora, nedavno je prepoznat potencijal endofitnih gljiva zahvaljujući sposobnosti da proizvedu sekundarne metabolite različitih bioloških aktivnosti. Biosinteza ovih jedinjenja je pod velikim uticajem brojnih faktora koji se vezuju za izbor biljke domaćina, klimatske uslove, ishranu i prisustvo drugih mikroorganizama u okruženju. Velika baza podataka vezanih za aktivnost endofitnih gljiva prema patogenim bakterijama pretraživana je primenom metode analize glavnih komponenti sa ciljem pronalaženja obrazaca u podacima koji bi ukazali na manji broj pravih kandidata za razvoj novih lekova. Na ovaj način, osvetljen je antimikrobni karakter gljive *Phomopsis species*. *In vitro* testovima je potvrđeno da dihlormetanski ekstrakt gljive izolovane iz četina bora inhibira rast bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Hromatografsko razdvajanje pojedinačnih jedinjenja ekstrakta optimizovano je primenom dizajna eksperimenata, a zatim je izvršeno izolovanje i karakterizacija njihove hemijske strukture korišćenjem masene spektrometrije i NMR spektroskopije. *In silico* metodama su definisani prediktori bioraspoloživosti i toksikološke aktivnosti jedinjenja (Z)-(Z)-2-acetoksi-prop-1-en-1-il-3-(3-((E)-3,4-

dihidroksipent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat i (Z)-(Z)-2-acetoksi-1-prop-1-en-1-il-3-((E)-4-hidroksi-3-oksopent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat. Za razliku od dosadašnjih istraživanja koja su se ograničavala *in vitro* testovima antimikrobne aktivnosti endofitnih gljiva i razrešavanjem hemijske strukture izolovanih biomolekula, ova disertacija predstavlja proširenje prethodnih istraživanja primenom *in silico* metoda. Studija molekuskog *dokinga* omogućila je razumevanje mehanizama interakcije biomolekula sa receptorima koji pripadaju patogenim bakterijama uobičajeno multirezistentnim na antibiotike. Primenom veštačkih neuronskih mreža nagrađeni su pouzdani modeli koji ukazuju na vezu između hemijske strukture, parametara interakcije i afiniteta vezivanja za receptore na osnovu kojih je moguć razvoj novih hemijski srodnih antibiotika.

F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu izveštaja iz programa *iThenticate* registrovano je 9 % poklapanja sa 98 izvora. U svim izvorima je stepen podudarnosti iznosio < 1 %, i četiri izvora sa kojima je stepen sličnosti iznosio 1 %. Ovaj stepen podudarnosti posledica je tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata istraživanja kandidata, koji su proistekli iz disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj iz programa *iThenticate* ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Beograd, Republika Srbija, mentor doktorske disertacije

U Beogradu, _____

G. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom podrazumeva ispitivanje antimikrobnog potencijala biomolekula endofitnih gljiva primenom savremenih računarskih tehnika pomoću kojih je izvršena identifikacija ključnih faktora koji ukazuju na antimikrobnost aktivnosti endofitnih gljiva prema patogenim bakterijama; procena antimikrobne aktivnosti sekundarnih metabolita endofitnih gljiva *Phomopsis spp.* izolovanih iz četina četinara koji rastu na području Slovenije; izolovanje i razotkrivanje hemijske strukture bioaktivnih molekula primenom pogodnih separacionih i spektroskopskih metoda; primenom algoritama mašinskog učenja za razvoj i validaciju modela za opisivanje veze između hemijske strukture, ponašanja u izabranim analitičkim sistemima i eksperimentalno izmerenog (*in vitro*) ili *in silico* procenjenog biološkog odgovora sekundarnih metabolita endofitnih gljiva; predviđanjem strukturnih karakteristika jedinjenja za ciljne vrednosti biološkog odgovora, kao i predviđanjem ključnih fizičko-hemijskih parametra, lipofilnosti molekule i *pKa* vrednosti, kao prediktora biološke raspoloživosti nakon *in vivo* primene potencijalno novog leka; ispitivanjem najverovatnijih mehanizama antimikrobnog delovanja biomolekula endofitnih gljiva na receptorima koji predstavljaju potvrđeno ciljno mesto delovanja do sada poznatih antimikrobnih lekova izvođenjem studija molekuskog *docking-a* i procenom mogućnosti za optimizaciju hemijske strukture i postizanje povoljnijeg antimikrobnog efekta.

Zadati istraživački ciljevi su ispunjeni i dobijeni rezultati su doprineli boljem razumevanju ispitivanog sistema. Rezultati ove disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Analitika lekova i šire budući da primenjen multidisciplinarn pristup obuhvata i prostor Medicinske hemije. Rad kandidata je odgovorio istraživačkim zahtevima, što je potkrepljeno sa **2 naučna rada** koji su objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima **M23** kategorije, **1 naučni rad** objavljen u naučnom časopisu od nacionalnog značaja (kategorije **M52**), i **4 saopštenja** sa međunarodnih skupova, štampana u izvodu ili celosti (kategorije **M32, M34 i M64**). Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj Komisije o izrađenoj doktorskoj disertaciji na temu „**Istraživanje antimikrobne aktivnosti i hromatografskog ponašanja sastojaka endofitnih gljiva primenom hemometrijskih metoda**“ i kandidatu mag. farm. Janku Ignjatoviću **odobri** javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

*Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske
disertacije kandidata mag. farm. Janka Ignjatovića*

Prof. dr sc. Borut Štrukelj, redovni profesor, Univerzitet
u Ljubljani – Farmaceutski fakultet, Katedra za
farmaceutsku biologiju, Ljubljana, Republika Slovenija

Prof. dr sc. Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku
lekova, Beograd, Republika Srbija

Dr sc. Ana Protić, vanredni profesor, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku
lekova, Beograd, Republika Srbija

Dr sc. Brankica Filipić, vanredni profesor, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za
mikrobiologiju i imunologiju, Beograd, Republika Srbija

U Beogradu, _____