

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију</p> <p>Дана 08. 06. 2016. године на седници Наставно-научног већа Медицинског факултета у Новом Саду именована је Комисија за оцену докторске дисертације кандидата Маје Ђанић под насловом: "Утицај соли жучних киселина на продор и метаболизам симвастатина у пробиотским бактеријама".</p>
<p>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:</p> <p>1. <b>Проф. др Кармен Станков</b>, ванредни професор, ужа научна област биохемија, изабрана у звање ванредног професора 01.09.2012., Медицински факултет Нови Сад;</p> <p>2. <b>Проф. др Велибор Васовић</b>, редовни професор, ужа научна област Фармакологија са токсикологијом, изабран у звање редовног професора 13.11.2013., Медицински факултет Нови Сад;</p> <p>3. <b>Проф. др Силва Добрић</b>, редовни професор, ужа научна област Фармакологија са токсикологијом, изабрана у звање редовног професора 22.11.2007. Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду</p>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p>Маја, Перо, Ђанић</p>

2. Датум рођења, општина, држава:

27. март 1987., општина Сомбор, Република Србија

3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: Медицински факултет, основне студије фармације, дипломирани фармацеут

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:  
2010. година, Докторске академске студије, смер 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 ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:** Утицај соли жучних киселина на продор и метаболизам симвастатина у пробиотским бактеријама

#### **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Докторска дисертација кандидата Маје Ђанић је написана систематично, јасним и разумљивим стилем на 156 страница. Садржи све неопходне делове научног рада који су организовани у 8 поглавља: увод, циљеви и хипотезе истраживања, експериментални део, резултати, дискусија, закључак, литература и прилог (публиковани радови). Дисертација садржи 13 графикона, 11 табела и 44 слике. Литература са 214 референци у складу је са важећим правилима за цитирање.

#### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**Наслов** докторске дисертације је јасно и прецизно формулисан и у складу је са садржајем рада.

**У уводу** докторске дисертације аутор даје основне податке о групи хипохолестеролемијских лекова – статина, са посебним освртом на симвастатин, његове фармацеутско-хемијске, фармаколошке и фармакокинетске особинама. Дат је детаљан преглед аналитичких метода за испитивање симвастатина и његових нечистоћа у биолошком материјалу и фармацеутским облицима. Такође, увод докторске дисертације пружа информације о значају цревне микрофлоре и пробиотика у метаболизму лекова као и о последицама које том приликом могу настати. Дат је детаљан преглед ензимске активности и транспортних протеина

пробиотских бактерија који учествују у транспорту лекова.

Аутор се затим осврће на улогу жучних киселина у модификацији транспорта лекова кроз различите биолошке мембране. Истакнути су фактори који утичу на биолошку расположивост лекова, са посебним освртом на растворљивост и пермеабилност лековитих супстанци. Представљен је значај испитивања дистрибуционог коефицијента као модела за испитивање пасивног транспорта. Поред тога, истакнута је улога докинг студија у испитивањима интеракција лека са транспортерима на нивоу ћелијских мембрана.

Литературни преглед је актуелан, опсежан, написан јасно и систематично, и пружа свеобухватан увид у истраживану проблематику.

**Циљеви истраживања:** С обзиром на претходно изнета сазнања, постављени су следећи циљеви: испитивање продора и метаболизма симвастатина у пробиотским бактеријама, испитивање утицаја жучних киселина (холна, 12-монокетохолна и деоксихолна) на продор симвастатина у пробиотске бактерије, испитивање утицаја соли поменутих жучних киселина на расподелу симвастатина у систему октанол/пуфер, испитивање интеракција поменутих жучних киселина са симвастатином на нивоу транспортних протеина пробиотских бактерија (*Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium longum*).

**Хипотезе** су следеће: 1) Симвастатин у значајној мери продире и метаболише се у пробиотским бактеријама 2) Испитиване жучне киселине повећавају продор симвастатина у пробиотске бактерије 3) Испитиване жучне киселине значајно мењају расподелу симвастатина у систему октанол/пуфер 4) Постоје значајне интеракције испитиваних жучних киселина са симвастатином на нивоу транспортних протеина пробиотских бактерија (*Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium longum*).

Циљеви рада и радне хипотезе су јасно изложени, прецизно формулисани и омогућавају доношење конкретних закључака.

**Материјал и методе** одговарају принципима методологије научно-истраживачког рада. Методологија је јасно и прецизно описана у раду. Целокупно истраживање је изведено на Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета у Новом Саду у периоду од јануара 2014. године до октобра 2015. године. Први део експеримента обухватао је *in vitro* испитивања понашања симвастатина при инкубацији са пробиотским бактеријама као и утицај жучних киселина на транспорт симвастатина у пробиотске бактерије. Идентификација и квантификација узорака вршена је методом течне хроматографије са масеном спектроскопијом (LC-MS/MS). Одређивање дистрибуционог коефицијента симвастатина је рађено методом мућкања тј. „Shake-flask“ методом. Докинг анализе афинитета жучних киселина према транспортерима испитиваних пробиотских бактерија су извршене помоћу програма SwissDock. Уз помоћ различитих компјутерских техника и софтверских

пакета вршене су додатне анализе које су служиле за објашњавање добијених ескперименталних резултата. Статистичка обрада добијених резултата испитивања је рађена статистичким програмом IBM SPSS Statistics, верзија 21.

Поставка методологије је таква да се истраживање може поновити. Изабране методе одговарају постављеним циљевима и омогућавају добијање конкретних и квалитетних научних резултата. Примењене методе статистичке обраде података у потпуности су адекватне и примерене истраживачком задатку.

**Резултати** испитивања су уверљиво, прегледно и стручно приказани табеларно и графички. Подељени су у више целина због разумљивости и јасно демонстрирају претходно текстуално објашњене елементе. Резултати произилазе из примењене методологије уз коришћење адекватних статистичких метода. Резултати су приказани су прегледно, разумљиво и на начин примерен типу података.

**Дискусија** је свеобухватна и јасно написана. Стил писања дискусије је у складу са српским језиком, јасан, прецизан и разумљив. Кандидат аргументовано и критички анализира резултате истраживања и компарира их са релевантним наводима из литературе. Литературни подаци су адекватно одабрани, актуелни и релевантни за извођење валидних закључака из проучаване проблематике. Коментари и тумачења резултата су логични. Дискусија добијених резултата је исцрпна, научно утемељена, те указује на завидно познавање проучаване проблематике уз критички осврт у односу на актуелну литературу.

**Закључци** су реални, приказани прегледно и логично изведени из добијених резултата и дискусије. Изнети закључци су потпуно у складу са задацима и циљевима испитивања.

**Литература** – Коришћена литература је обимна, савремена и правилно одабрана према захтевима теме која се разматра. Литературни подаци су наведени у складу са Харвардским правилима. Литература је приказана кроз 214 библиографских јединица релевантних за испитивану тематику.

У **прилогу** се налазе радови публиковани у часописима са ИСИ листе, који су већ проистекли из резултата докторске 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.

#### **M21**

1. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life Sci (HFSP Journal)*. 2013; 7(3-4):112-22.
2. Stojančević M, Bojić G, Salami HA, Mikov M. The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs. *Curr Issues Mol Biol*. 2013;16(2):55-68.

#### **M22**

1. Đanić (Stojančević) M, Pavlović N, Stanimirov B, Vukmirović S, Nikolić K, Agbaba D, Mikov M. The influence of bile salts on the distribution of simvastatin in octanol/buffer system. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(4):661-7.

#### **M23**

1. Đanić (Stojančević) M, Pavlović N, Stanimirov B, Stojančević T, Goločorbin-Kon S, Bojić G, Mikov M. Docking-based preliminary study on the interactions of bile acids with drugs at the transporter level in intestinal bacteria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(3):553-60.
2. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, Mukkur TK, Mikov M, Lalic-Popovic M, Stojančević M, Golocorbin-Kon S, Al-Salami H. An advanced microencapsulated system: a platform for optimized oral delivery of antidiabetic drug-bile acid formulations. *Pharm Dev Technol*. 2015;20(6):702-9.
3. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, Mukkur T, Mikov M, Lalic-Popovic M, Stojančević M, Golocorbin-Kon S, Al-Salami H. Stability and Release Kinetics of an Advanced Gliclazide-Cholic Acid Formulation: The Use of Artificial-Cell Microencapsulation in Slow Release Targeted Oral Delivery of Antidiabetics. *J Pharm Innov*. 2014;9:150-7.
4. Bojić G, Milošević V, Gusman V, Považan A, Stojančević M. The contribution of gut microflora to paracetamol metabolism. *Arch Biol Sci*. 2014; 66(1): 75-8.
5. Stojančević M, Stankov K, Mikov M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol*. 2012; 26(9): 631-7.

#### **M51**

1. Bojić G, Golocorbin Kon S, Stojančević M, Mikov M, Suvajdzić Lj. Metabolic activity of gut microbiota and xenobiotics. *Zbornik matice srpske za prirodne nauke*. 2015;128(1):47-55.

**M52**

1. Bojić G, Milić S, Mikov M, Stojančević M, Golocorbin Kon S, Ugarković J. Mesto probiotika u sastavu crevne flore. *Medicina Danas*. 2015;14(4-6):65-71.

**M53**

1. Mikov M, Stojančević M, Bojić G. Probiotics as a promising treatment for inflammatory bowel disease. *Hospital Pharmacology*. 2014; 1(1):52-60.

**VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу резултата истарживања изведени су следећи закључци:

Резултати експеримента показали су да приликом двадестчетворочасовне инкубације симвастатина са пробиотским бактеријама из рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, које чине део нормалне цревне микрофлоре, долази до високог степена преузимања симвастатина од стране пробиотских бактерија.

Утврђено је да се део симвастатина метаболише под дејством ензима пробиотских бактерија. Техником течне хроматографије купловане са тандемском масеном спектрометријом извршена је детаљна квалитативна анализа метаболита симвастатина. Детектовано је 8 метаболичких продуката и потом је извршена њихова структурна идентификација и интерпретација.

У контроли је у одређеној мери забележено присуство метаболичких продуката услед присуства у полазној супстанци. Њихове концентрације у контролној групи су одржане стабилним током времена. Утврђено је да инкубација са пробиотским бактеријама доводи до пораста концентрације метаболита. Статистички значајан пораст концентрације забележен је само код метаболита М-452, тј. хидроксилованог деривата симвастатинске киселине. Доказано је да су пробиотске бактерије значајно смањиле спонтану деградацију лека.

На основу израчунатих вредности молекулских дескриптора, утврђено је да мале структурне промене код метаболита у односу на симвастатин доводе до великих разлика у физичко-хемијским и фармакокинетским својствима испитиваних једињења.

Показано је да испитиване жучне киселине готово не утичу на транспорт симвастатина у пробиотске бактерије. Ипак, мале разлике уочене су са деоксихолном и 12-монокетохолном киселином које су смањиле продор у бактерије. Применом *in silico* методе молекулског докинга и на основу резултата одређивања дистрибуционог коефицијента, у извесној мери су разјашњени ефекти добијени током *in vitro* испитивања.

Утврђено је да испитиване соли жучних киселина доводе до статистички значајног смањења дистрибуционог коефицијента симвастатина односно до повећавања растворљивости у воденом слоју при физиолошким рН вредностима услед формирања хидрофилнијих комплекса између симвастатина и жучних киселина. Повећање

растворљивости испитиваног лека додатком жучних киселина могло би да послужи као основа нових фармацеутских формулација симвастатина са побољшаним физичко-хемијским и фармакокинетским особинама. Како је 12-монокетохолна киселина показала најизраженије ефекте у погледу смањења logD симвастатина, као и због своје специфичне структуре и ниског мембранолитичког потенцијала, ова жучна киселина се предлаже као кандидат за даља испитивања у циљу развоја нових формулација са побољшаним фармакокинетским особинама.

Резултатима докинг студија процењено је да испитиване жучне имају већи афинитет према чак 80% *multidrug* транспортера бактерија *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus acidophilus* у односу на симвастатин. Утврђено је да најјачи афинитет према највећем броју испитиваних транспортера, има 12-монокетохолна киселина. Ови подаци говоре о могућности остваривања интеракција жучних киселина са симвастатином на нивоу транспортних протеина.

**VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА** Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат је показао систематичан научно-истраживачки приступ анализи великог броја добијених резултата. Резултати истраживања у односу на постављене циљеве приказани су систематично, детаљно су обрађени и критички продискутовани. Графички прикази и табеле доприносе прегледности резултата. Подаци добијени у току истраживања обрађени су и анализирани помоћу адекватних статистичких тестова. Изабрани начин приказа резултата истраживања, као и целокупно тумачење резултата начињеног истраживања су примерени, добро одабрани, као и прегледно и разложно предочени, те их Комисија оцењује позитивно.

**IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

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:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Докторска дисертација садржи све битне елементе научно-истраживачког рада на основу којих би се истраживање могло поновити.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација даје оригиналан научни допринос из области метаболизма лекова под дејством цревне микрофлоре и пробиотика као и улоге жучних киселина у модификацији продора лекова кроз биолошке мембране. Предмет истраживања је добро одабран, а резултати ове докторске дисертације указују на значај пробиотских бактерија и жучних киселина у терапијском одговору симвастатина. На основу претходно наведеног закључује се да су добијени резултати нови и оригинални и могу да представљају добру полазну основу за даља испитивања утицаја пробиотика и жучних киселина на судбину других лекова у организму. Актуелност теме потврђују све чешће студије сличне проблематике, које су спроведене у свету последњих година као и већ публиковани радови који су проистекли из различитих делова ове докторске дисертације.

Студије о метаболизму лекова путем цревне микрофлоре требало би да постану саставни део развојног пута лекова. Разумевање утицаја цревне микрофлоре на фармаколошки и безбедносни профил лекова је од круцијалне важности за пројектовање фармакокинетице лекова, као и неходан корак у у откривању и развоју нових лекова са побољшаним фармакокинетским параметрима. Жучне киселине, као супстанце које утичу на растворљивост и продор лековитих супстанци кроз биолошке мембране, се предлажу као кандидати за даља испитивања у циљу развоја нових фармацевтских формулација са побољшаним фармакокинетским особинама.

#### 4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Докторска дисертација не садржи формалне нити суштинске недостатке који би могли утицати на резултате истраживања.

#### **X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

- да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана
- да се докторска дисертација враћа кандидату на дораду (да се допуни односно измени) или
- да се докторска дисертација одбија

На основу позитивних вредновања појединих делова, као и укупне позитивне оцене докторске дисертације, Комисија за оцену докторске дисертације, са задовољством, предлаже да се докторска дисертација кандидата дипл. фарм. Маје Ђанић, под насловом „Утицај соли жучних киселина на продор и метаболизам симвастатина у пробиотским бактеријама“ прихвати, а кандидату омогући спровођење поступка јавне одбране.



Дана 15.06.2016. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

---

Проф. др Кармен Станков, ванредни професор  
Медицинског факултета у Новом Саду,  
Универзитета у Новом Саду

---

Проф. др Велибор Васовић, редовни професор  
Медицинског факултета у Новом Саду,  
Универзитета у Новом Саду

---

Проф. др Силва Добрић, редовни професор,  
Медицински факултет Војномедицинске академије  
Универзитета одбране у Београду

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.