

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Ljiljane M. Tolić, master inženjera tehnologije

Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu br. 35/481 od 30. novembra 2017. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Ljiljane M. Tolić, master inženjera tehnologije, pod naslovom: **„Određivanje anizomicina tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijским metodama i primena na ispitivanje stabilnosti leka i njegove raspodele u tkivima pacova”**. Posle pregleda dostavljene disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

R E F E R A T

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- Školske 2011/2012. godine Ljiljana Tolić je upisala doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, na smeru Hemija, pod mentorstvom dr Mile Laušević.
- 18. januara 2016. godine Ljiljana Tolić je predložila temu doktorske disertacije pod naslovom „Ispitivanje farmakokinetike anizomicina u tkivima i praćenje stabilnosti metodom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom”.
- 28. januara 2016. godine na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka (br. 35/16) o imenovanju Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata Ljiljane Tolić, master inženjera tehnologije, za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme pod nazivom: „Ispitivanje farmakokinetike anizomicina u tkivima i praćenje stabilnosti metodom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom” u sastavu dr Mila Laušević, red. prof. TMF-a, dr Svetlana Grujić, van. prof. TMF-a, dr Slobodan Petrović, red. prof. TMF-a u penziji i dr Slavica Ražić, red. prof. Farmaceutskog fakulteta.
- 14. aprila 2016. godine na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, odlukom br. 35/196, usvojen je izveštaj Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske disertacije. Za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Mila Laušević, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta.
- 28. aprila 2016. godine na sednici Veća naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu odloženo je razmatranje zahteva za davanje saglasnosti na predlog teme doktorske disertacije kandidata Ljiljane Tolić uz obrazloženje da je potrebno dostaviti odobrenje Etičkog komiteta za rad na životinjskim uzorcima. Takođe, predloženo je da se u naslov teme doda izraz „elektrohemijske metode”, kao i da se u Komisiju za pregled i ocenu teme uključi stručnjak kompetentan za oblast farmakokinetike sa Farmaceutskog fakulteta (odluka br. 61206-2014/2-16).

- 26. maja 2016. godine na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka (br. 35/258) o prihvatanju izveštaja Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata Ljiljane Tolić za izradu doktorske disertacije pod nazivom: „Određivanje anizomicina tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijским metodama i primena na ispitivanje stabilnosti leka i njegove raspodele u tkivima pacova”. Za mentora doktorske disertacije imenovana je dr Mila Laušević, redovni profesor TMF-a. U Komisiju je uključen član dr Branislava Miljković, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta, kao stručnjak kompetentan za oblast farmakokinetike. Takođe, uz izveštaj je dostavljeno Rešenje Etičke komisije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. EK-BF-2013/04) kojim se daje dozvola za rad sa životinjama, životinjskim organima i tkivima.
- 30. juna 2016. godine na sednici Veća naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Ljiljane Tolić pod nazivom: „Određivanje anizomicina tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijским metodama i primena na ispitivanje stabilnosti leka i njegove raspodele u tkivima pacova” (odluka br. 61206-3208/2-16).
- 29. septembra 2017. godine, rešenjem br. 20/123 Tehnološko-metalurškog fakulteta, odobreno je produženje statusa studenta doktorskih studija u trajanju od dva semestra.
- 30. novembra 2017. godine na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka (br. 35/481) o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Ljiljane Tolić, pod nazivom: „Određivanje anizomicina tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijским metodama i primena na ispitivanje stabilnosti leka i njegove raspodele u tkivima pacova” u sastavu: dr Mila Laušević, red. prof. TMF-a u penziji, dr Svetlana Grujić, van. prof. TMF-a, dr Slobodan Petrović, prof. emeritus TMF-a, dr Slavica Ražić, red. prof. Farmaceutskog fakulteta i dr Branislava Miljković, red. prof. Farmaceutskog fakulteta.

1.2. Naučna oblast disertacije

Tema ove doktorske disertacije pripada naučnoj oblasti **Hemijske nauke** za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu. Za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Mila Laušević, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koja ispunjava sve neophodne uslove da rukovodi izradom ove disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Ljiljana Tolić je rođena 16. juna 1986. godine u Aranđelovcu. Osnovnu školu „Milan Ilić-Čiča” u Aranđelovcu završila je kao nosilac Vukove diplome 2001. godine. Gimnaziju „Miloš Savković”, prirodno-matematički smer, u Aranđelovcu završila je sa odličnim uspehom 2005. godine.

Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijska tehnologija, smer Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo, upisala je školske 2005/2006. godine. Diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 8,54. Diplomski rad pod nazivom „Ispitivanje mešljivosti polimetilmetakrilata sa cikloolefinskim kopolimerom” odbranila je sa ocenom 10.

Master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijska tehnologija, smer Polimerno inženjerstvo, upisala je školske 2009/2010. godine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom u toku studija 9,88. Master rad pod nazivom „Ispitivanje mogućnosti primene hidrogelova hitozana i metakrilne kiseline za kontrolisano otpuštanje diklofenak-natrijuma” odbranila je sa ocenom 10.

Školske 2011/2012. godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, smer Hemija, pod rukovodstvom dr Mile Laušević, redovnog profesora Tehnološko-metalurškog fakulteta. Na doktorskim studijama je položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10 i odbranila završni ispit. Na početku školske 2017/2018. godine odobreno je produženje statusa studenta doktorskih studija u trajanju od dva semestra.

Od novembra 2011. godine Ljiljana Tolić je zaposlena u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač na projektu osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Razvoj i primena metoda i materijala za monitoring novih zagađujućih i toksičnih organskih materija i teških metala”. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u septembru 2015. godine.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Ljiljane Tolić napisana je na 118 strana i sadrži 49 slika i 15 tabela. Disertacija obuhvata sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Teorijski deo (38 strana), Eksperimentalni deo (17 strana), Rezultati i diskusija (44 strana), Zaključak (2 strane) i Literatura (130 navoda, 13 strana). Pored toga, dati su izvodi na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, zahvalnica, kao i biografija kandidata i spisak radova proisteklih iz doktorske disertacije. Po strukturi i sadržaju, disertacija zadovoljava propisane standarde Univerziteta u Beogradu.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U **Uvodu** je dat prikaz problematike koja je obrađena u ovoj doktorskoj disertaciji. Predstavljen je cilj istraživanja, a to je razvoj, optimizacija, validacija i primena nove, brze i osetljive metode tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) za analizu tragova antibiotika anizomicina u biološkim uzorcima (mozgu, srcu, slezini, jetri, bubrezima, butnom mišiću i serumu), u cilju određivanja raspodele leka u organima i određivanja farmakokinetičkih parametara leka nakon potkožnog injektovanja Wistar albino pacovima. Takođe, cilj ove doktorske disertacije je i definisanje uslova sprovođenja studije forsirane degradacije anizomicina, u skladu sa ICH[§] smernicama, u cilju ispitivanja stabilnosti ovog multifunkcionalnog leka primenom LC-MS/MS metode. Pored toga, cilj ovog rada je i razvoj novih elektrohemijskih metoda (ciklične voltometrije i voltometrije sa pravougaonim impulsima) koje bi, pored LC-MS/MS metode, služile za praćenje degradacije i određivanje elektrohemijskog ponašanja anizomicina.

U **Teorijskom delu** je dat detaljan literaturni pregled oblasti istraživanja doktorske disertacije. Dat je pregled fizičko-hemijskih karakteristika anizomicina i navedene su oblasti gde postoji mogućnosti kliničke primene ovog multifunkcionalnog leka. Skrenuta je pažnja na važnost poznavanja farmakokinetičkih svojstava leka koja utiču na potencijalnu kliničku primenu, kao i na poznavanje njegove stabilnosti pod uticajem različitih faktora u cilju utvrđivanja kvaliteta leka i bezbednosti njegovog korišćenja. Objasnjeno je zašto je značajno poznavanje obima raspodele leka u pojedinim organima, a pored toga su definisani i farmakokinetički parametri odabrani za analizu u ovoj studiji. Objasnjeno je princip izvođenja studija forsirane degradacije u skladu sa ICH

[§] ICH, eng. *International Conference of Harmonization*

smernicama (Q1A(R2) i Q1B) u cilju procenjivanja stabilnosti leka u određenom vremenskom periodu pod uticajem različitih faktora. Takođe je istaknuto da ne postoji metoda za kvantitativno određivanje anizomicina koja bi se primenila u farmakokinetičkoj studiji, kao i to da nije ustanovljena njegova stabilnost pod uslovima koji su propisani zvaničnim smernicama. Objašnjena je složenost analitičkog određivanja tragova lekova u kompleksnim uzorcima, poput bioloških, pri čemu je potrebno posebno posvetiti pažnju na odmašćivanje i deproteinizaciju u cilju poboljšanja ekstrakcije analita, kao i na prečišćavanje uzorka. Dat je literaturni pregled metoda pripreme i analize bioloških uzoraka u cilju određivanja lekova, kao i pregled različitih stres uslova pod kojima se izvode studije forsirane degradacije lekova. Takođe, dat je i pregled pravilnika i smernica za sprovođenje validacije bioanalitičkih metoda (FDA[§] pravilnik) i metoda koje se koriste za ispitivanje stabilnosti lekova (ICH smernica Q2(R1)). Detaljno su objašnjeni principi analitičkih metoda tečne hromatografije, masene spektrometrije, uz opis korišćene tehnike jonizacije i masenih analizatora, kao i korišćenih elektrohemijskih metoda (ciklične voltometrije (CV) i voltometrije sa pravougaonim impulsima (SWV)).

U **Eksperimentalnom delu** je opisan razvoj instrumentalne metode analize tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom za analizu anizomicina. Objašnjen je način snimanja masenih spektara leka, optimizacija hromatografskih i LC-MS/MS parametara, kao i korišćena LC-UV analiza. Opisan je razvoj metode pripreme uzoraka biološkog materijala za analizu, uz opis optimizacije parametara koji imaju najviše uticaja na efikasnost ekstrakcije, kao i optimizacija prečišćavanja dobijenih ekstrakata. Zatim je opisana validacija razvijene bioanalitičke metode i navedeni su parametri koje je potrebno odrediti u skladu sa FDA pravilnikom, kao i korišćene metode kalibracije. Takođe je dat detaljan opis eksperimenata sa životinjama za *in vivo* studiju u kojoj je primenjena razvijena, optimizovana i validirana metoda u cilju određivanja raspodele leka u organizmu i utvrđivanja farmakokinetičkih parametara nakon potkožnog injektovanja anizomicina Wistar albino pacovima*. Dat je detaljan opis pripreme uzoraka i postupka forsirane degradacije anizomicina pod različitim uslovima, kao što su kisela, bazna i neutralna sredina, izloženost oksidacionom sredstvu, povišenoj temperaturi i svetlosti. Takođe je dat opis validacije metode korišćene za analizu uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije u skladu sa ICH smernicom Q2(R1). Detaljno su opisani uslovi rada i postupak pripreme uzoraka za elektrohemijsku analizu.

U poglavlju **Rezultati i diskusija** prikazani su i opsežno analizirani dobijeni rezultati. Na osnovu masenih spektara anizomicina utvrđeno je da se primenom elektrosprej jonizacije u pozitivnom režimu rada postiže stabilna jonizacija analita. Odabrani su optimalni LC-MS/MS parametri i predložena je karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon za identifikaciju i kvantifikaciju anizomicina. Na osnovu rezultata optimizacije postupka pripreme uzoraka biološkog materijala, utvrđeno je da se najviši prinosi dobijaju korišćenjem metanola kao rastvarača u postupku ultrazvučne ekstrakcije, za deproteinizaciju je korišćena trihlorsirćetna kiselina, a za odmašćivanje uzoraka heksan, dok su kao optimalni kertridži za prečišćavanje odabrani Oasis HLB. Metoda validirana na šest ispitivanih tkiva i serumu je prema definisanim parametrima validacije pokazala dobru selektivnost, tačnost, preciznost, ponovljivost, linearnost, osetljivost i efikasnost ekstrakcije. U *in vivo* studiji je pronađeno da je koncentracija anizomicina u serumu niža u poređenju sa koncentracijama izmerenim u analiziranim tkivima. Ustanovljeno je da anizomicin ima najveću koncentraciju u mozgu, zatim slezini, srcu, butnom mišiću i jetri, dok je najmanja koncentracija u bubrezima. Najviša koncentracija anizomicina izmerena u mozgu je u skladu sa činjenicom da je primarno mesto delovanja ovog leka upravo mozak. Maksimalne koncentracije anizomicina u svim tkivima su postignute tokom tri sata od primene. Zaključeno je da se anizomicin brzo apsorbuje i postepeno eliminiše iz analiziranih tkiva, kao i da se najbrža akumulacija i eliminacija anizomicina postiže u srcu. Takođe su predstavljeni i

[§] FDA, eng. *Food and Drug Administration*

* Izvođenje eksperimenata na pacovima je odobreno od strane Etičke komisije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj dozvole EK-BF-2013/04, izdate 6. 5. 2013. godine).

optimalni hromatografski parametri za analizu uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije anizomicina. Pokazalo se da je razvijena metoda validirana u skladu sa ICH Q2(R1) smernicom specifična, tačna, ponovljiva, osetljiva, linearna i robusna. Na osnovu rezultata studije forsirane degradacije zaključeno je da je anizomicin izuzetno nestabilan u baznoj sredini, kao i da pokazuje veliku nestabilnost u termičkim (neutralna sredina) uslovima, dok je umereno stabilan u kiseloj i neutralnoj sredini, kao i pri termičkim (kisela sredina) i fotolitičkim uslovima. Najniži nivo degradacije anizomicina se postiže u prisustvu svetla i oksidacionog sredstva. Pokazano je da se pri svim testiranim uslovima formira isti degradacioni proizvod, identifikovan kao deacetilanzomicin. Takođe je na osnovu dobijenih rezultata pretpostavljen mehanizam degradacije anizomicina. Ispitivanjem elektrohemijske aktivnosti anizomicina, primenom CV i SWV metoda i uporednim ispitivanjem LC-MS/MS metodom, ustanovljeno je da je oksidacija anizomicina nepovratan i difuziono kontrolisan proces i pokazano je da pri elektrohemijskoj degradaciji anizomicina nastaje jedan degradacioni proizvod, isti kao i u studiji forsirane degradacije, deacetilanzomicin.

U poglavlju **Zaključak** sumirani su i pregledno navedeni postignuti rezultati, a potom je navedena i literatura koja obuhvata relevantne radove iz oblasti istraživanja citirane u doktorskoj disertaciji.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Istraživanja prikazana u ovoj tezi su originalna i u skladu sa savremenim svetskim trendovima ispitivanja raspodele i farmakokinetičkih svojstava lekova, kao i njihove stabilnosti i načina degradacije. Međutim, u dosadašnjoj literaturi nije prikazano ispitivanje raspodele, farmakokinetičkih parametara i stabilnosti anizomicina pod uslovima forsirane degradacije, kao ni ispitivanje njegove elektrohemijske aktivnosti. S obzirom na to da je anizomicin multifunkcionalni lek koji ima potencijalnu kliničku primenu kao citostatik, imunosupresor i psihofarmaceutik, postoji potreba za razvijanjem metode za određivanje ovog leka koja bi se primenila u farmakokinetičkoj studiji i u studiji forsirane degradacije u cilju razumevanja njegove stabilnosti pod uslovima koji su propisani zvaničnim smernicama. Za određivanje tragova anizomicina u tkivima i serumu, kao i u uzorcima dobijenim u studiji forsirane degradacije, a takođe i za određivanje proizvoda degradacije, primenjena je metoda tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom, uz korišćenje elektrosprej jonizacije. Ova selektivna i osetljiva metoda predstavlja najsavremeniju tehniku za identifikaciju i kvantitativno određivanje polarnih i termički nestabilnih jedinjenja u kompleksnim uzorcima kao što su tkiva i serum, pri izuzetno niskim koncentracijama. Elektrohemijske metode (CV i SWV) uz primenu elektrode od zlata kao radne elektrode su korišćene za elektrohemijske analize. Navedene elektrohemijske metode su brze i osetljive, i mogu se koristiti za određivanje leka kako u rastvoru, tako i u biološkim tečnostima.

U doktorskoj disertaciji Ljiljane Tolić razvijene su nove, brze i osetljive analitičke metode za određivanje tragova leka anizomicina u biološkim uzorcima i uzorcima dobijenim ispitivanjem degradacije leka, što je u skladu sa savremenim istraživanjima. Takođe je u okviru ovog istraživanja postignuto hromatografsko razdvajanje anizomicina i njegovog proizvoda degradacije.

U *in vivo* studiji ustanovljeno je da se anizomicin raspodeljuje u organima prema sledećem redosledu: mozak > slezina > srce > butni mišić > jetra > bubrezi, a takođe su određeni i najvažniji farmakokinetički parametri, što su novine u ispitivanju svojstava ovog leka. Na osnovu dobijenih rezultata u studiji forsirane degradacije su izvedeni zaključci o stabilnosti anizomicina pod različitim uslovima i utvrđeno je po kom mehanizmu se odvija proces oksidacije ovog leka. Pored

toga je identifikovan i proizvod degradacije leka i pretpostavljen je mehanizam degradacije anizomicina koji do sada nije predstavljen u literaturi.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U doktorskoj disertaciji citirano je 130 literaturnih navoda, od kojih najveći deo čine noviji radovi u relevantnim međunarodnim časopisima. Tokom izrade teze, detaljno je pregledana literatura usmerena na problematiku određivanja antibiotika u biološkim uzorcima (tkivima i serumu) pacova, kao i u uzorcima dobijenim u studiji forsirane degradacije leka. Takođe su sveobuhvatno pregledani radovi vezani za određivanje raspodele i farmakokinetičkih parametara lekova u organizmima eksperimentalnih životinja. Iz obrazloženja predložene teme doktorske disertacije, prikaza korišćene literature, kao i objavljenih radova kandidata, uočava se dobro poznavanje savremenih svetskih trendova u oblastima istraživanja.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

U ovoj doktorskoj disertaciji je korišćena metoda tečne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom, kao jedna od najsavremenijih analitičkih metoda za pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju tragova ispitivanog leka anizomicina. Za maseno-spektrometrijsku analizu korišćeni su 2D i 3D jonski trap. Kao jonizaciona tehnika korišćena je elektrosprej jonizacija, tehnika koja je najčešće korišćena za jonizaciju lekova prilikom analize uzoraka biološkog materijala i uzoraka koji se dobijaju prilikom ispitivanja stabilnosti leka. Za efikasnu ekstrakciju anizomicina iz uzoraka biološkog materijala korišćene su metode ultrazvučne ekstrakcije i tečno-tečne ekstrakcije, koje karakterišu brzina i jednostavnost izvođenja. Za prečišćavanje uzoraka korišćena je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi. Ispitivanje stabilnosti leka je sprovedeno u skladu sa ICH smernicama Q1A(R2) i Q1B u prisustvu kiseline, baze, vode, oksidacionog sredstva, povišene temperature i svetlosti. Za ispitivanje elektrohemijske aktivnosti anizomicina primenjene su različite elektrohemijske metode (ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima) uz korišćenje elektrode od zlata kao radne elektrode.

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Pregledom literature iz oblasti istraživanja, kao i rezultata proisteklih iz doktorske disertacije, može se zaključiti da je ostvaren značajan doprinos u unapređenju postojećih i razvoj novih, osetljivih i pouzdanih analitičkih metoda za identifikaciju lekova u biološkom materijalu, u cilju primene u farmakokinetičkoj studiji, i u uzorcima nastalim ispitivanjem degradacije i elektrohemijske aktivnosti anizomicina. Razvojem metode za kvantitativno određivanje anizomicina, uspostavljanjem profila njegove raspodele po organima i određivanjem najvažnijih farmakokinetičkih parametara, kao i određivanjem osetljivosti anizomicina na različite faktore i pretpostavljanjem mehanizma degradacije ovog leka, potpomognut je razvoj mehanizma dejstva anizomicina i pružene su značajne informacije za njegovu potencijalnu kliničku primenu. Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije verifikovani su i od strane svetske naučne javnosti, objavljivanjem u vrhunskim međunarodnim časopisima, jednom međunarodnom časopisu, kao i prezentovanjem dobijenih rezultata na nacionalnim konferencijama.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Ljiljana M. Tolić je tokom izrade doktorske disertacije pokazala stručnost i samostalnost u pregledu naučne literature, pripremi i realizaciji eksperimenata, izvođenju instrumentalnih metoda analize, kao i obradi i kritičkoj analizi dobijenih rezultata. Na osnovu dosadašnjeg rada i postignutih rezultata, Komisija smatra da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalni naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

U okviru ove doktorske disertacije ostvareni su sledeći naučni doprinosi:

- razvoj, optimizacija i validacija nove, brze i osetljive metode tačne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom za određivanje anizomicina u biološkim uzorcima i uzorcima dobijenim u studiji forsirane degradacije;
- razvoj efikasne metode pripreme bioloških uzoraka za analizu anizomicina u kompleksnim uzorcima, kao što su tkiva i serum;
- ispitivanje raspodele anizomicina u tkivima i serumu i određivanje farmakokinetičkih parametara u *in vivo* studiji;
- razvoj i validacija metode za praćenje stabilnosti leka prema ICH smernicama;
- ispitivanje elektrohemijske aktivnosti anizomicina;
- pretpostavljanje mehanizma degradacije i identifikacija degradacionog proizvoda anizomicina.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Istraživanja u okviru disertacije koncipirana su na osnovu jasno definisanih ciljeva i detaljne analize literaturnih podataka relevantnih za oblast istraživanja. U tezi su razvijene i primenjene savremene analitičke metode, poput tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijskih metoda (CV i SWV), za pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju anizomicina kako u biološkim uzorcima, tako i u uzorcima dobijenim u studiji forsirane degradacije leka. Primenom razvijenih metoda uspostavljen je profil raspodele leka u organizmu pacova, kao i njegovi najvažniji farmakokinetički parametri nakon primene. Na ovaj način je potvrđeno da je mozak primarno mesto delovanja ovog leka i pružene su informacije koje mogu pomoći da se bliže objasni mehanizam dejstva anizomicina. Pored toga, pokazano je da je ovaj lek izuzetno osetljiv na prisustvo baze, ali i na povišenu temperaturu, dok najveću stabilnost od svih ispitivanih uslova pokazuje u prisustvu oksidacionog sredstva i svetlosti. Takođe je identifikovan i proizvod degradacije anizomicina i pretpostavljen je mehanizam degradacije. Sve ovo može biti od velike pomoći pri potencijalnom korišćenju ovog leka, u smislu određivanja uslova proizvodnje, korišćenja ili skladištenja.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Ljiljana M. Tolić je rezultate istraživanja ove doktorske disertacije potvrdila njihovim objavljivanjem u vrhunskim međunarodnim časopisima, međunarodnom časopisu, kao i prezentovanjem radova na nacionalnim skupovima. Iz disertacije su proistekla dva rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jedan rad prihvaćen za objavljivanje u međunarodnom časopisu (M23), jedan rad objavljen u zborniku skupa nacionalnog značaja štampan u celini (M63) i dva rada objavljena u zbornicima skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Kategorija M21

1. **Tolić, Lj.**, Lović, J., Mijin, D., Petrović, S., Grujić, S., Laušević, M., Avramov Ivić, M.: Investigation of electrochemical behavior of anisomycin on gold electrode followed by HPLC-MS/MS analysis, *Electrochemistry Communications*, Vol. 58, pp. 20-24, 2015 (**IF=4,847**) (ISSN 1388-2481).
2. **Tolić, Lj.**, Grujić, S., Mojović, M., Jovanović, M., Lubec, G., Bačić, G., Laušević, M.: Determination of anisomycin in tissues and serum by LC-MS/MS: application to pharmacokinetic and distribution studies in rats, *RSC Advances*, Vol. 6, pp. 92479-92489, 2016 (**IF=3,840**) (ISSN 2046-2069).

Kategorija M23

1. **Tolić, Lj.**, Grujić, S., Laušević, M.: Development and validation of a stability-indicating LC–UV and LC–MS/MS methods for quantitative analysis of anisomycin and identification of degradation products, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, prihvaćen rad, 2017 (**IF=0,474**) (ISSN 1984-8250).

Kategorija M63

1. **Tolić, Lj.**, Grujić, S., Lubec, G., Laušević, M.: „Determination of antibiotic anisomycin in tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry”, *51. savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Niš, Srbija, 2014, Zbornik radova, pp. 7-10 (ISBN: 978-86-7132-055-9)

Kategorija M64

1. **Tolić, Lj.**, Grujić, S., Laušević, M.: „Ispitivanje stabilnosti anizomicina metodom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom”, *4. konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2016, Kratki izvodi radova, pp. 30.
2. **Tolić, Lj.**, Antić, N., Grujić, S., Bačić, G., Laušević, M.: „Određivanje anizomicina u životinjskim tkivima”, *6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine EnviroChem 2013*, Vršac, Srbija, 2013, Knjiga izvoda, pp. 208-209.

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu svega navedenog Komisija smatra da doktorska disertacija Ljiljane Tolić, pod nazivom „**Određivanje anizomicina tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijskim metodama i primena na ispitivanje stabilnosti leka i njegove raspodele u tkivima pacova**”, predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u oblasti Hemijskih nauka, što je potvrđeno objavljivanjem radova u vrhunskim međunarodnim časopisima, međunarodnom časopisu i prezentovanjem rezultata na nacionalnim konferencijama. Imajući u vidu kvalitet, obim i naučni doprinos postignutih rezultata, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da podnetu doktorsku disertaciju Ljiljane M. Tolić prihvati, izloži na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu, kao i da nakon završetka ove procedure pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije, pred Komisijom u istom sastavu.

Beograd,
18. decembar 2017. god.

ČLANOVI KOMISIJE

.....
Dr Mila Laušević, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Svetlana Grujić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Slobodan Petrović, profesor emeritus
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Slavica Ražić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

.....
Dr Branislava Miljković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

ЕТИЧКА КОМИСИЈА
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Решење бр. ЕК-БФ- 2013/04

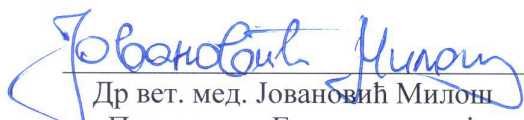
ДОЗВОЛА ЗА РАД СА ЖИВОТИЊАМА, ЖИВОТИЊСКИМ ОРГАНИМА И
ТКИВИМА

Поводом захтева **Љиљане Толић**, истраживача сарадника, за издавање дозволе за рад са животињама, животињским органима и ткивима у сврхе истраживања за израду докторске дисертације у којима би се користили пацови *Wistar* соја, Етичка комисија Биолошког факултета је након детаљног разматрања захтева донела **позитивно решење***.

Тема докторске дисертације гласи:

„ **Одређивање анизомицина течном хроматографијом са тандем масеном спектрометријом и електрохемијским методама и примена на испитивање стабилности лека и његове расподеле у ткивима пацова** ”

У Београду,
06.05.2013. године


Др вет. мед. Јовановић Милон
Председник Етичке комисије
Биолошки факултет