

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ	
1.	Датум и орган који је именовao комисију 24.02.2020. године, Наставно-научно веће Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду
2.	Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: др Едвард Петри , ванредни професор, ужа научна област: Биохемија, датум избора у звање: 23.09.2018., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет - председник др Андреа Николић , доцент, ужа научна област: Органска хемија, датум избора у звање: 15.04.2015., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет – члан др Сузана Јовановић-Шанта , ванредни професор, ужа научна област: Биохемија, датум избора у звање: 07.03.2016., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет - ментор др Анђелка Ћелић , ванредни професор, ужа научна област: Молекуларна биологија, датум избора у звање: 17.07.2018., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет - ментор др Радивоје Продановић , редовни професор, ужа научна област: Биохемија, датум избора у звање: 13.11.2019., Универзитет у Београду, Хемијски факултет - члан
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ	
1.	Име, име једног родитеља, презиме: Софија, Стојан, Бекић
2.	Датум рођења, општина, држава: 09.09.1990., Нови Сад, Србија
3.	Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, мастер академске студије биохемије, мастер биохемичар
4.	Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2014. година, докторске академске студије биохемије
5.	Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /
6.	Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Развој биолошких тестова за идентификацију лиганата стероидних рецептора и испитивање активности стероидогеног ензима ароматазе

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Докторска дисертација Софије Бекић „Развој биолошких тестова за идентификацију лиганата стероидних рецептора и испитивање активности стероидогеног ензима ароматазе” је написана на српском језику, латиничним писмом са кључном документацијском информацијом на српском и енглеском језику. Написана је на 186 страна и садржи 20 табела, 73 слике и 302 литератurna навода. Дисертација је организована у 7 поглавља: Увод (3 стране), Општи део (50 страна), Циљ истраживања (2 стране), Експериментални део (46 страна), Резултати и дискусија (53 стране), Закључак (5 страна) и Литература (17 страна). Пре поменутих поглавља се налазе Предговор, Списак скраћеница и Садржај, а након списка литературних навода следи Биографија кандидата и Кључна документацијска информација.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасно и прецизно формулисан, одражава суштину испитиване проблематике и директно указује на циљ испитивања.

У поглављу **Увод** укратко је описан предмет истраживања докторске дисертације. Указано је на значај, али и на изазове развоја специфичних антиканцерских агенаса за лечење хормонски зависних болести и стања. Посебна пажња посвећена је канцерима репродуктивних ткива, који представљају глобални здравствени проблем, а у чијој генези стероидни хормони имају важну улогу. Кандидат је истакао да ефикасни терапијски приступи обухватају снижавање концентрације стероидних хормона, селективном инхибицијом одређених ензима стероидогенезе, и/или спречавање начина деловања блокирањем стероидних рецептора. Због лакоће модификовања структурних карактеристика као могући терапеутици са великим потенцијалом издвајају се стероидна једињења. С обзиром на то да су главне терапијске мете стероидни рецептори и стероидогени ензим ароматаза, у Уводу је указано је на значај развоја високо специфичних, економичних и безбедних експерименталних метода за испитивање њихових лиганата и инхибитора.

Комисија сматра да је кандидат у уводном делу докторске дисертације јасно указао на проблематику истраживања и навео све потребне информације.

Поглавље **Општи део** обухвата преглед владајућих ставова у научној литератури из области биохемије стероида, односно представља прегледни приказ постојећих података о стероидним хормонима, њиховим рецепторима и ензиму ароматази и организовано је у 3 тематске целине. Увођење у тематику докторске дисертације кандидат започиње описујући структурне карактеристике, биосинтезу и механизам деловања стероидних хормона, затим њихову физиолошку и патофизиолошку улогу у развоју канцера дојке и простате и могућности лечења ових хормонски-зависних болести применом хормонске терапије. С обзиром на то да сигналинг стероидних хормона има главну улогу у канцерогенези репродуктивних органа, кандидат је јасно указао на терапеутски потенцијал њихових структурних аналога, као и нестероидних фитоестрогена, природно присутних у биљкама, а структурно у одређеној мери сличних ендогеним естрогенима. У другој целини Општег дела изнет је детаљан преглед литературе везане за структуру и функцију стероидних рецептора, са фокусом на естрогеном и андрогеном рецептору. Кандидат је описао неколико метода за испитивање интеракција између стероидних рецептора и њихових потенцијалних лиганата, при чему је посебно издвојио флуоресцентни хелијски биосензор у квасцу и *in silico* методе, као предмет истраживања докторске дисертације. Описом кључног ензима биосинтезе естрогених хормона, ароматазе, његовог потенцијалног механизма деловања, начинима инхибиције, као и одабраним методама за испитивање његове активности и идентификацију лиганата завршава се Општи део. Посебна пажња усмерена је на рекомбинантну експресију ароматазе у бактеријама и квасцима, као модел-системима, као и на методе за детекцију везивања лиганата праћењем флуоресценције остатка триптофана у активном центру ароматазе или спинског стања гвожђа из хем групе. Проблематика ове докторске дисертације је интересантна и актуелна, стога је и потреба за спроведеним истраживањима оправдана.

Комисија констатује да је поглавље Општи део свеобухватно и систематично написано, са логично распоређеним и јасним прегледом досадашњих сазнања за сваки обрађени сегмент, изнетим на основу консултовања великог броја литературних извора, чиме је кандидат показао изузетно добро познавање проблематике докторске дисертације.

У поглављу **Циљ истраживања** јасно је дефинисан циљ сваке од фаза истраживања у оквиру докторске дисертације. Кандидат је конципирао ово поглавље поделом на два специфична циља са заједничким задатком откривања фармаколошки потентних једињења. Први специфичан циљ био је усмерен на развој и оптимизацију високо специфичног, репродукцибилног и широко применљивог теста за идентификацију природних и синтетских лиганада стероидних рецептора коришћењем квасца *Saccharomyces cerevisiae* као модел-организма, чиме би се ефикасно испитивао биомедицински потенцијал стероида, а елиминисала употреба радиоактивних супстрата, па тиме и опасност по здравље и животну средину. Истичући важност инхибиције ароматазе у третману естроген-зависног канцера дојке, кандидат као други специфичан циљ докторске дисертације наводи развој и оптимизацију теста за испитивање активности овог ензима и процену везивања потенцијалних лиганада, чијом комбинацијом би се могли идентификовати нови инхибитори ароматазе.

Комисија је сагласна да је кандидат јасно представио циљеве истраживања и да су наведени циљеви усклађени са оним наведеним у пријави теме докторске дисертације.

У четвртном поглављу, **Експериментални део**, детаљно су описане биохемијске и молекуларно-биолошке методе коришћене током развоја тестова за идентификацију и квантификацију везивања лиганада стероидних рецептора, као и за мерење активности ароматазе, без и уз присуство инхибитора. Поред *in vitro* експеримената, описана је и метода за *in silico* предвиђање везивања лиганада за испитиване биомолекуле. Поред експерименталних процедура у овом поглављу дате су и информације о коришћеним сојевима бактерија и квасаца у истраживању, медијумима за њихово гајење, плазмидним конструктима, а приказане су и структуре великог броја испитиваних једињења.

Комисија оцењује да су примењене методе савремене и одговарајуће за реализацију постављених циљева истраживања и да су у потпуности у складу са процедурама представљеним у пријави теме докторске дисертације. Кандидат је експерименталне поступке приказао јасно и са довољно детаља чиме је другим истраживачима омогућена поновљивост анализа.

Резултати и дискусија су, у циљу прегледности и једноставности тумачења, дати као целина. Резултати истраживања су приказани стручно, уверљиво и прегледно са великим бројем табеларних и графичких приказа, као и одговарајућих слика, праћених адекватним текстуалним објашњењима. Кандидат је објективно и са критичким освртом на актуелне литературне податке анализирао добијене резултате и изложио их на свеобухватан и исцрпан начин. Поголавље Резултати и дискусија разумљиво је написано и представља оригинални научни допринос. Ово поглавље је подељено на 11 потпоглавља која прате редослед фаза истраживања наведених у Циљу истраживања и Експерименталном делу. На почетку је дат преглед коришћених вектора уз детаљан опис начина на који су добијени, као и резултати верификације ових конструката агарозном електрофорезом. Кандидат је затим темељно описао и продискутовао оптимизацију нетранскрипционог флуоресцентног теста у квасцу за детекцију лиганада андрогених и две изоформе естрогених рецептора и навео резултате измереног афинитета везивања великог броја стероидних деривата овако оптимизованим тестом за сва три рецептора. Поређењем измерених афинитета везивања за стероидне рецепторе, антипролиферативног деловања на одабране туморске ћелијске линије и енергија везивања, добијеним *in silico* анализом, омогућен је јаснији увид у потенцијални механизам деловања одабраних једињења. У једном од потпоглавља Резултата и дискусије приказани су резултати везивања познатих фитоестрогена за естрогени рецептор β применом флуоресцентног ћелијског биосензора и дискутован естрогени потенцијал екстраката одабраних биљних врста, познатих по високом садржају ових фенолних компоненти. Наведени су и проблеми са респирацијом одређених сојева квасаца и протоколима за њихову ефикасну трансформацију са којима се кандидат срео током експерименталног рада. Једно потпоглавље

посвећено је улози цитохром Р450-редуктазе (СУР), њеној неопходности за активност ароматазе, као и извору овог редокс ензима коришћеном током експерименталног рада, док је посебно описана стратегија за експресију ароматазе у бактеријама и изоловање протеина у лиганд-независној форми. Да би био остварен други постављени специфични циљ истраживања, у дисертацији су развијени једнокомпонентни и двокомпонентни ензимски тестови за испитивање активности ароматазе у присуству или одсуству инхибитора. У првом је експресија функционалне ароматазе постигнута у једном модел-систему (квасцу са оптимизованом редокс средином), док је код другог активност ензима потврђена комбиновањем ароматазе изоловане из бактерија и цитохром Р450-редуктазе пореклом из квасца. На крају овог поглавља описана је провера активности ароматазе, као и детекција везивања одабраних стероида за овај ензим, осетљивим спектроскопским техникама. Кандидат је на основу резултата тестова развијених у оквиру докторске дисертације као интересантне кандидате за даља испитивања у пољу терапије хормонски зависних болести посебно издвојио неколико модификованих стероида, код којих је идентификовао значајан афинитет везивања за стероидне рецепторе, инхибиторни потенцијал према ароматази и/или значајно везивање за овај ензим .

Комисија сматра да је кандидат прецизно и тачно обрадио резултате истраживања, јасно и систематично их груписао у логичке целине и опсежно написао дискусију у којој је упоредио добијене резултате са резултатима сличних студија, што у великој мери доприноси научној вредности ове докторске дисертације.

У поглављу **Закључак** су јасно, прегледно и сажето изнети закључци проистекли из добијених резултата истраживања представљених у одељку Резултати и дискусија. Истакнут је њихов значај, као и потенцијална примена у будућности. Кандидат закључује да су оптимизованим флуоресцентним тестом у квасцу отворена врата новом начину идентификације и квантификација везивања читавих библиотека једињења, потенцијалних лиганада стероидних рецептора, попут модификованих стероида или ксеноестрогена. Важност резултата добијених у оквиру докторске дисертације се огледа у примени овог специфичног и осетљивог теста као „алатке” за скрининг једињења која делују путем модулације сигналних путева стероидних рецептора, као што су антихормонски агенси. У оквиру Закључка посебно је истакнут и есенцијални биомедицински значај развијеног теста за испитивање активности ароматазе и њених интеракција са лигандима, као и инхибиторног ефекта одабраних модификованих стероида према овом ензиму. Описано је како комбинација *in vitro* тестова развијених у оквиру докторске дисертације, *in silico* студија и испитивања антипролиферативног потенцијала према ћелијама хормонски зависних канцера може представљати прелиминарну фазу испитивања која претходи *in vivo*, преклиничким и клиничким испитивањима, кључну за селекцију оних једињења која заслужују пажњу на дугом путу развоја лека. На основу детектоване биолошке активности испитиваних једињења комбиновањем различитих метода, у Закључку су истакнута она која највише обећавају у терапији естроген- и андроген-зависних болести. У оквиру овог поглавља аргументовано су изнете и чињенице које дају одговор на питање зашто су овде развијени биолошки тестови супериорнији од појединих који се тренутно употребљавају у исте сврхе.

Комисија оцењује да су изведени закључци концизни, поуздани и научно засновани и да у потпуности дају одговоре на постављене циљеве истраживања.

Одељак **Литература** садржи нумерички организовану листу адекватно одабраних публикација (302), савремених и значајних у области истраживања.

Комисија је мишљења да је литература цитирана у оквиру докторске дисертације релевантна и у складу са предметом истраживања и постављеним циљевима, као и да су све референце наведене прегледно и прецизно на одговарајућим местима у тексту.

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

Резултати ове докторске дисертације су до сада објављени у два рада у часописима међународног значаја, пет саопштења са међународног скупа штампана у изводу и пет саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу.

M22- Рад у истакнутом међународном часопису

Savić, M. P., Ajduković, J. J., Plavša, J. J., **Bekić, S. S.**, Ćelić, A. S., Klisurić, O. R., Jakimov, D. S., Petri, E. T., Djurendić, E. A. (2018): Evaluation of A-ring fused pyridine D-modified androstane derivatives for antiproliferative and aldo-keto reductase 1C3 inhibitory activity. *Med. Chem. Commun.* 9: 969–981. [DOI: 10.1039/c8md00077h]

M23- Рад у истакнутом међународном часопису

Bekić, S. S., Marinović, M. A., Petri, E. T., Sakač, M. N., Nikolić, A. R., Kojić, V. V., Ćelić, A. S. (2018): Identification of D-seco modified steroid derivatives with affinity for estrogen receptor α and β isoforms using a non-transcriptional fluorescent cell assay in yeast. *Steroids*. 130: 22-30. [DOI: 10.1016/j.steroids.2017.12.002]

M34-Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

Ćelić, A., Petri, E., **Bekić, S.**, Marinović, M., Plavša, J., Sakač, M. (2018): Use of hormone-sensitive fluorescent biosensors and in vitro assays for characterization of steroidal compounds with antiproliferative activity against breast and prostate cancer cell lines. *The 43rd FEBS congress*, Prague, Czech Republic, Book of Abstracts: 261.

Ćelić, A., Petri, E., **Bekić, S.**, Marinović, M., Sakač, M. (2017): Identification of steroidal compounds with anticancer properties using yeast-based bioassays. *28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)*, Prague, Czech Republic, Book of Abstracts: 243.

Bekić, S., Sakač, M., Jovanović-Šanta, S., Petri, E., Ćelić, A. (2017): Steroid receptor binding affinities of selected modified steroids-a screening tool for identification of potential therapeutics. *10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry*, Dubrovnik (Srebreno), Croatia, Book of Abstracts: 214.

Bekić, S., Marinović, M., Plavša, J., Petri, E., Jovanović-Šanta, S., Sakač, M., Nikolić, A., Ćelić, A. (2016): Evaluation of the steroid receptor binding affinity of some selected steroid derivatives by fluorescent cellular biosensor. *International Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina*, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, Book of Abstracts: 58.

Bekić S., Jovanović-Šanta, S., Petri, E., Ćelić, A. (2015): Development of cellular fluorescent biosensors for the detection and quantification of ligands of estrogen receptor beta. *III Simpozijum biologa i ekologe Republike Srpske*, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, Book of Abstracts: 122.

M64-Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

Bekić, S., Krstić, S., Ćelić, A., Petri, E., Jovanović-Šanta, S. (2019) Optimization of ligand binding assay in yeast for identification of phytoestrogens with affinity for estrogen receptor β . *Serbian Biochemical Society Ninth Conference*, Beograd, Serbia, Book of Abstracts: 78.

Marinović, M., **Bekić, S.**, Petri, E., Ćelić, A. (2017): Molecular docking and fluorescent yeast assay in targeting potential steroid receptor ligands. *1st Congress of Molecular Biologists of Serbia*, Beograd, Serbia, Book of Abstracts: 54.

Bekić, S., Marinović, M., Plavša, J., Jovanović-Šanta, S., Petri, E., Ćelić, A. (2016) Optimization of highly specific fluorescent assay in *Saccharomyces cerevisiae* for the identification of androgen receptor ligands and quantification of their binding affinity. *53rd Meeting of the Serbian Chemical Society*, Kragujevac, Serbia, Book of Abstracts: 75.

Bekić S., Plavša J., Marinović M., Jovanović-Šanta, S., Petri, E., Ćelić, A. (2016): Fluorescent cellular biosensor as a tool for detection and quantification of ligands of androgen receptor. *43rd Annual Conference on Yeast*, Smolenice, Slovakia, Book of Abstracts: 66.

Bekić, S., Marinović, M., Plavša, J., Jovanović-Šanta, S., Petri, E., Ćelić, A. (2015) Development of a highly specific and nonradioactive method for identification and screening of estrogen receptor β ligands. *Third Conference of Young Chemists of Serbia*, Beograd, Serbia, Book of Abstracts: 63.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу изложених резултата, а у складу са постављеним циљевима кандидат је изнео следеће закључке:

-У циљу испитивања релативног афинитета везивања широког спектра деривата стероидних хормона за стероидне рецепторе (естрогени рецептор α и β , андрогени рецептор), кроз више експерименталних фаза успешно је оптимизован тест у квасцу. Овај тест се не заснива на праћењу транскрипције нити коришћењу радиоактивних супстрата, него на мерењу интензитета флуоресценције, као последице флуоресцентног резонантног трансфера енергије између два жута флуоресцентна протеина, до које долази услед димеризације лиганд-везујућег домена стероидног рецептора експримираног у *Saccharomyces cerevisiae* након везивања лиганда, при чему је интензитет детектоване флуоресценције у корелацији са афинитетом овог везивања.

-Закључено је да постоји одлична корелација између афинитета везивања измерених флуориметријом и флуоресцентном микроскопијом, чинећи прву методу детекције, с обзиром на једноставност и брзину извођења, методом од избора када је у питању прелиминарни скрининг и селекција једињења за даљу квантификацију афинитета везивања на нивоу појединачне ћелије флуоресцентном микроскопијом и дензитометријом.

-Предности развијеног флуоресцентног ћелијског теста у квасцу у односу на друге тестове за процену андрогеног и естрогеног потенцијала испитиваних једињења су, поред велике осетљивости и специфичности, још и могућност идентификације свих једињења која остваре везивање за лиганд-везујући домен, без обзира на то да ли могу да активирају транскрипциону машинерију, затим изостанак употребе додатних супстрата за визуализацију, мерење флуоресценције целих ћелија у суспензији без потребе за лизирањем и то, што за разлику од скупе специјализоване опреме неопходне за проточно-цитометријску анализу, овај тест користи одговарајући слободно доступан програм за дензитометријску анализу.

-Флуоресцентним тестом у квасцу омогућена је идентификација и квантификација везивања читавих библиотека модификованих стероида за одабране стероидне рецепторе одмах након њихове синтезе, што овај тест чини скрининг „алатком” за детекцију потенцијалних антихормонских агенаса који делују путем модулације сигналних путева посредованих стероидним рецепторима.

-Највеће ограничење оптимизованог теста је немогућност да се одговори на питање да ли идентификовани лиганд делује као агониста или антагониста стероидног рецептора, те је неопходна комбинација са другим методама за процену биолошког одговора.

-У оквиру докторске дисертације процењено је да се D- хомолактони андростанске серије **5, 9 и 18** и D-секо естрански деривати **2 и 3** везују за естрогени рецептор α , са сличним афинитетом као природни лиганди, док су као лиганди са високим афинитетом за естрогени рецептор β идентификовани естрански деривати **2, 3, 59, 60 и 73**. Лиганди који се са највећим афинитетом везују за андрогени рецептор су једињења андростанске серије **72, 75 и 76**. Код неких

идентификованих лиганада уочена је структурна сличност у А прстену са природним супстратима, сугеришући значај тог дела молекула за везивање. За стероидне молекуле **2**, **3**, **9** и **18** уочено је неспецифично унакрсно везивање и за друге изоформе стероидних рецептора, те се овим тестом на брз и једноставан начин ова једињења могу елиминисати из даљих истраживања, као и сва једињења која испољавају нежељена андрогена и/или естрогена својства, што је веома значајно код дизајна инхибитора ензима стероидогенезе.

-Поређење резултата флуоресцентног хелијског теста са резултатима испитивања антипролиферативног ефекта према хормон-зависним туморским ћелијама које експримирају естрогени рецептор и симулацијама молекуларног докинга указује на то да постоји сагласност, те да се може претпоставити механизам деловања испитиваних једињења. Тако је за естрански секоцијанобромид **2**, са идентификованим високим афинитетом везивања за естрогени рецептор β у квасцу, *in silico* предвиђеном сличном оријентацијом и енергијом везивања као естрадиол и *in vitro* измереним умереним антипролиферативним ефектом према естроген-зависним ћелијама канцера дојке, кандидат указао на могућност да механизам његовог антипролиферативног деловања обухвата блокирање сигналног пута у којем учествује целуларни естрогени рецептор.

-Применом флуоресцентног хелијског теста у квасцу за мерење афинитета везивања фитоестрогена за естрогени рецептор β и естрогеног потенцијала екстраката вирка, црвене детелине и сладића установљене су оптималне вредности испитиваних концентрација генистеина, даидзеина, формонетина, биоханина А и глицитеина, као и висок естрогени потенцијал етанолних екстраката црвене детелине и сладића при концентрацијама 0,5 mg/ml и 0,1 mg/ml, респективно, сугеришући значајан фармаколошки потенцијал биљака са ових простора богатих биоактивним молекулима. Закључено је и да је екстракција фитоестрогенских компоненти из вирка била ефикаснија мацерацијом у 70% етанолу у односу на водени екстракт.

-Развијена процедура за испитивање активности ароматазе и њених инхибитора коришћењем квасца и/или бактерија као модел-система може се употребити за идентификацију једињења која би се једног дана могла користити за лечење естроген-зависних канцера. Једнокомпонентни ензимски тест развијен у оквиру ове докторске дисертације није показао репродуцибилност, вероватно услед проблема са хелијском респирацијом квашчевог соја, те су експерименти настављени коришћењем нешто комплекснијег двокомпонентног ензимског теста, у ком се микростоми ћелија WhR соја, са геномски интегрисаном цитохром Р450-редуктазом, комбинују са изолованом рекомбинантном хуманом ароматазом експримираном у DH5 α ћелијама *Escherichia coli*. Двокомпонентним тестом је препознат значајан инхибиторни ефекат два андростанска једињења, D-холо лактона **33** и 17 α -пиколит деривата **63**, према ароматази, док за иста једињења није детектована андрогена нити естрогена активност флуоресцентним хелијским тестом у квасцу, указујући на то да ова стероидна једињења заслужују даља испитивања у пољу развоја селективних терапеутика за лечење канцера дојке. У двокомпонентном ензимском тесту је одређен и оптималан однос концентрација обе компоненте ароматаза-цитохром Р450 редуктаза комплекса, неопходан за каталитичку функцију.

-Апсорпционом и флуоресцентном спектроскопијом, праћењем промена спинског стања гвожђа из хем групе ароматазе и промена у унутрашњој флуоресценцији протеина, као једињења са потенцијалом да се вежу за ароматазу су окарактерисани модификовани стероиди **52**, **55** и **63**. Сумирањем резултата у оквиру другог специфичног циља дисертације закључено је да постоји сагласност између метода за мерење везивања за ароматазу, које су, заједно са тестом инхибиције ензимске активности ароматазе, од кључног значаја за откриће нових инхибитора са терапеутским својствима у лечењу глобално распрострањеног канцера дојке, једног од водећих узрочника смрти међу женском популацијом.

-Кандидат је изнео генерални закључак да комбинација у оквиру дисертације развијених *in vitro* тестова за идентификацију лиганада естрогенских и андрогенских рецептора и инхибитора ароматазе, уз додатне *in silico* студије и испитивање утицаја на пролиферацију ћелија канцера зависних од деловања стероидних хормона, представља прелиминарну фазу истраживања, незаобилазну на дугом путу открића и развоја лека. Кандидат истиче и то да тестови за процену фармаколошког

потенцијала развијени у докторској дисертацији не могу функционисати независно од осталих метода са истим циљем.

Комисија сматра да су формулисани закључци логично изведени из добијених резултата истраживања и да су у потпуности одговорили на постављене циљеве докторске дисертације. Изведени закључци јасно одражавају значај и научни допринос спроведеног истраживања.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Прегледом дисертације кандидата Софије Бекић Комисија закључује да теза има јасну форму, да је систематична и прегледна као и да су истраживања спроведена у складу са планом датим у пријави теме. Кандидат је веома студиозно приступио обради и анализи великог броја експерименталних података и систематизовао их у логичке целине. Резултати добијени у овој докторској дисертацији, поред тога што су детаљно презентовани и структурно добро организовани, графички и табеларно су добро интерпретирани, правилно анализирани и критички упоређени са релевантним резултатима из литературе. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају јасне одговоре на постављене циљеве докторске дисертације.

Комисија оцењује позитивном оценом начин приказа и тумачења резултата истраживања ове докторске дисертације.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Да, Комисија оцењује да је докторска дисертација у целини написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Да, Комисија оцењује да докторска дисертација садржи све битне елементе неопходне за овакву врсту рада: преглед познатих истраживања у области, дефинисану тему и циљеве истраживања, детаљан опис коришћених експерименталних метода, систематизован приказ добијених резултата и њихову дискусију, правилно изведене закључке и списак литературе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Реализацијом ове докторске дисертације флуоресцентни тест у квасцу се по први пут примењује за брзи прелиминарни скрининг везивања синтетисаних стероидних једињења за α и β изоформе естрогеног рецептора или андрогени рецептор, у циљу идентификације стероидних једињења са значајним фармаколошким потенцијалом за лечење хормонски зависних канцера репродуктивних органа. Захваљујући резултатима овог теста, студијама антипролиферативне активности према естроген рецептор-позитивној ћелијској линији канцера дојке и студијама молекуларног докинга, предложен је могући механизам деловања D-секоестранског бромида **2**. На основу резултата истраживања у оквиру докторске дисертације изнета је претпоставка да је антипролиферативно деловање овог једињења посредовано блокирањем сигналног пута естрогеног рецептора јаким везивањем и формирањем халогене везе. Осим овог једињења, кандидат је идентификовао још неколико потенцијалних стероидних лиганата испитиваних рецептора, чиме је отворио врата проналажењу нових модулатора ових сигналних путева, укључених у канцерогенезу дојке, простате и јајника. У научној литератури до сада није објављена ни примена флуоресцентног ћелијског биосензора у тестирању познатих фитоестрогена и естрогеног потенцијала биљних екстраката, што је још један од оригиналних научних доприноса овог рада. У сојевима квасаца са оптимизованим редокс срединама, односно појачаном експресијом цитохром P450-редуктазе, до сада није експримирана функционална хумана ароматаза, што је у овој тези успешно постигнуто и показано да је детекција производа ензимске реакције поуздана и методама које не захтевају скупу специјализовану опрему, као што је танкослојна хроматографија праћена дензитометријом. Оригинално спроведених истраживања се огледа и у развоју двокомпонентног ензимског теста за испитивање активности ароматазе комбиновањем оба протеина неопходна за ароматизацију,

ароматазе и цитохром P450-редуктазе, из два различита извора, бактерије и квасца, респективно. У оквиру ове докторске дисертације су, применом развијених биолошких тестова, откривена два нова инхибитора ароматазе андростанске структуре, који су потенцијални кандидати за циљану хормонску терапију канцера дојке. Такође је значајна и идентификација потенцијалних лиганата ароматазе применом осетљивих спектроскопских метода са аспекта праћења конформационих промена услед промена спина гвожђа из хем групе или флуоресценције остатка триптофана из активног центра ензима. Праћењем померања Соретовог максимума ензима испитано је, до сада на овај начин неистражено, везивање познатог инхибитора ароматазе, форместана, док су комбинацијом обе методе идентификовани нови лиганди ароматазе стероидне структуре.

Напомена: Докторска дисертација је прошла проверу оригиналности применом софтвера за детекцију плагијаризма iThenticate који је показао да „индекс сличности” (*енгл.* similarity index) износи 2% (према упутству произвођача софтвера, све вредности испод 15% представљају оригиналан рад). Комисија закључује да је ова докторска дисертација оригинално дело и да не представља плагијат.

Комисија сматра да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног истраживања.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Комисија није уочила недостатке у докторској дисертацији кандидата Софије Бекић који би имали утицај на изложене резултате истраживања и извођење закључака.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

- да се докторска дисертација **„Развој биолошких тестова за идентификацију лиганата стероидних рецептора и испитивање активности стероидогеног ензима ароматазе”** прихвати, а кандидату Софији Бекић одобри одбрана.

У Новом Саду, 12.05.2020.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Едвард Петри, ванредни професор,
Природно-математички факултет, Универзитет у
Новом Саду, председник

др Андреа Николић, доцент, Природно-математички
факултет, Универзитет у Новом Саду, члан

др Сузана Јовановић-Шанта,
ванредни професор, Природно-математички факултет,
Универзитет у Новом Саду, ментор

др Анђелка Ћелић, ванредни професор,
Природно-математички факултет, Универзитет у
Новом Саду, ментор

др Радивоје Продановић, редовни професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду, члан