

MEDICINSKI FAKULTET

UNIVERZITET U NIŠU

Nastavno-naučnom veću; Odboru za posleddiplomske studije

Predmet: Izveštaj Komisije o izrađenoj doktorskoj disertaciji
dipl. farmaceuta Jovane Veselinović

Odlukom Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu br. 04-FT-1/08 od 4.7.2014. godine, nakon prihvatanja izveštaja mentora prof. dr Gorana Nikolića o izrađenoj doktorskoj disertaciji Veselinović Jovane, studenta DAS-toksikologija, pod odobrenim naslovom – „Farmakohemijski aspekti delovanja odabranih 4-fenil hidroksikumarina – integrisana *in vitro* i kompjuterska studija“, imenovani smo za članove komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije u sastavu:

Prof. dr Srđan Pešić, predsednik

Prof. dr Goran Nikolić, mentor i član

Prof. dr Gordana Kocić, član

Prof. dr Dušica Stojanović, član

Prof. dr Tatjana Mihajilov-Krstev, član sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu

Nakon detaljnog pregleda urađene doktorke disertacije Komisija podnosi sledeći

I Z V E Š T A J

1. Opšti podaci

Tema za izradu doktorske disertacije dipl. farmaceuta Jovane Veselinović odobrena je odlukom Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu br. 04-FT-1/08 od 24.4.2014. godine. Doktorant Jovana Veselinović je obavila svoja istraživanja u laboratorijama Katedre Hemija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Mikrobiološkoj laboratoriji Departmana za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu i Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

2. Tehnički opis doktorke disertacije

Doktorska disertacija dipl. farmaceuta Jovane Veselinović pod naslovom „Farmakohemijski aspekti delovanja odabranih 4-fenil hidroksikumarina – integrisana *in vitro* i kompjuterska studija“ napisana je na 119 strana i sastoji se od osam poglavlja: Uvod, Pregled literature, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. Doktorska disertacija sadrži 41 sliku, 9 šema, 19 tabela i 165 literaturnih referenci.

3. Sadržajna struktura doktorske disertacije

Urađena doktorska disertacija predstavlja originalan i samostalan naučno-istraživački rad sa jasno predstavljenim ciljevima koji su u skladu sa zadatom temom.

U poglavlju **Uvod** objašnjen je ukratko značaj problematike koja je predmet doktorske disertacije.

U poglavlju **Pregled literature** detaljno je dat prikaz dosadašnjih saznanja o nalaženju, biosintezi i biološkoj aktivnosti različitih kumarina, uključujući i 4-fenilkumarine (neoflavone). Prikazani su takođe osnovni principi metoda koje su korišćene u izradi doktorske disertacije za određivanje antioksidativne aktivnosti odabranih 4-fenil hidrosikumarina i opisani su mehanizmi delovanja antioksidanata sa posebnim osvrtom na značaj i delovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta u biološkim sistemima. Objasnjeni su osnovni principi DFT (*Density Functional Theory*) metode i mogućnosti njene primene za razjašnjenje mehanizama antioksidativnog delovanja različitih jedinjenja. Prikazani su i osnovni principi antibakterijskog delovanja i mehanizmi razvoja rezistencije na antibakterijske lekove sa naglaskom na veliki značaj ove pojave za savremenu medicinu. Opisani su osnovni principi metoda za ispitivanje antibakterijske aktivnosti sa naglaskom na mikrodilucionu metodu koja je korišćena u ovom radu. Objasnjena je mogućnost primene kompjuterske metode molekuskog dokinga za predviđanje antibakterijskog delovanja različitih supstanci preko određivanja afiniteta vezivanja za aktivna mesta karakterističnih bakterijskih enzima. Opisani su i osnovni principi primene kompjuterski generisanih QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) modela za ispitivanje farmakološke aktivnosti.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** su jasno i pregledno navedeni ciljevi doktorske disertacije:

1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti odabranih 4-fenil hidrosikumarina.
2. Uspostavljanje odnosa između strukture i antioksidativne aktivnosti primenom DFT deskriptora.
3. Određivanje mehanizma antioksidativnog delovanja na osnovu fizičko-hemijskih parametara dobijenih DFT proračunima.
4. Ispitivanje antibakterijskog delovanja odabranih 4-fenil hidrosikumarina na različite bakterijske sojeve.
5. Uspostavljanje korelacije između potencijalne antibakterijske aktivnosti i afiniteta vezivanja ispitivanih molekula za aktivno mesto bakterijskog enzima primenom kompjuterske metode molekuskog dokinga.
6. Uspostavljanje QSAR modela za odabrane farmakohemijske aktivnosti ispitivanih kumarina primenom Monte Carlo metode.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisani postupci korišćeni u primeni metoda odabranih za realizaciju ciljeva doktorske disertacije. Za određivanje antioksidativne aktivnosti odabranih 4-fenil hidrosikumarina (7-hidroksi-4-fenilkumarina (7S), 5,7-

dihidroksi-4-fenilkumarina (5,7S) i 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarina (7,8S)) korišćene su *in vitro* metode: DPPH[•], ABTS^{•+}, ispitivanje inhibicije lipidne peroksidacije u sistemu sa linoleinskom kiselinom ferri tiocijanat metodom, FRAP i CUPRAC. Upravo sa ispitivanim jedinjenjima, radi poređenja, određivana je i antioksidativna aktivnost nekih komercijalnih sintetskih antioksidanasa (butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), troloks i α -tokoferol). Statistička obrada rezultata određivanja antioksidativne aktivnosti vršena je primenom Dunett testa. Za određivanje antimikrobne aktivnosti odabranih 4-fenil hidrosikumarina primenjena je mikrodiluciona metoda, a ispitivanja su rađena protiv 20 različitih sojeva bakterija. Gaussian 09 molecular package softver je korišćen za DFT proračune i izračunavanje kvantno-mehaničkih parametara ispitivanih molekula u cilju utrdivanja korelacije sa eksperimentalnim podacima i određivanja mehanizma antioksidativne aktivnosti. Za kompjuterske studije molekuskog dokinga i određivanje afiniteta vezivanja ispitivanih molekula za aktivna mesta karakterističnih bakterijskih enzima korišćen je The Molegro Virtual Docker (MVD v. 2013.6.0.1.) softver. Za uspostavljanje QSAR modela zasnovanog na Monte Karlo metodi koji je primenjen za izračunavanje anti-HIV aktivnosti ispitivanih molekula korišćen je CORAL softver.

U poglavlju **Rezultati** jasno i pregledno su prikazani dobijeni rezultati. Određivanje antioksidativne aktivnosti metodama DPPH[•] i ABTS^{•+} pokazala su da 7,8S pokazuje značajno izraženiju aktivnost od standardnih komercijalnih antioksidanata, dok 7S i 5,7S nisu pokazali aktivnost ispitivanu ovim metodama. Svi ispitivani molekuli su pokazali efekat inhibicije lipidne peroksidacije pri čemu je stepen inhibicije ispitivanih 4-fenil hidrosikumarina opadao u nizu: 7,8S > 5,7S > 7S. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti metodama FRAP i CUPRAC pokazali su da 7,8S ima izraženiju redukcionu moć od 5,7S, dok 7S nije pokazao aktivnost. Izračunate vrednosti DFT deskriptora pokazuju da od ispitivanih molekula najizraženiju antioksidativnu aktivnost poseduje 7,8S što je u skladu sa eksperimentalnim podacima. Utvrđeno je da ispitivani kumarini pokazuju bolji inhibitorni efekat na gram-pozitivne u odnosu na gram-negativne bakterije, pri čemu su najslabiji efekat ispoljili na *P. aeruginosa* i *P. mirabilis* (7S čak nije ispoljio nikakav efekat). Svi ispitivani kumarini su pokazali najbolju antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *M. luteus*. Najslabiju antibakterijsku aktivnost od ispitivanih molekula pokazao je 7S, dok je 5,7S pokazao bolju antibakterijsku aktivnost za većinu testiranih bakterija u odnosu na 7,8S. Kompjuterske studije molekuskog dokinga pokazale su da najveći afinitet vezivanja za aktivno mesto enzima tirozil tRNK sintetaze ima 7,8S, dok najveći afinitet vezivanja za aktivno mesto enzima topoizomeraze II DNK Giraze β pokazuje 5,7S. QSAR model za anti-HIV aktivnost kumarinskih molekula zasnovan na Monte Karlo metodi imao je veoma dobre statističke parametre, dok molekulski doking ispitivanih 4-fenil hidrosikumarina za aktivno mesto HIV-1 integraze pokazuje da najveći afinitet vezivanja ima 7,8S. Izračunate fizičko-hemijske i molekulske karakteristike ispitivanih 4-fenil hidrosikumarina pokazuju da se ovi molekuli povinuju pravilima Lipinskog.

U poglavlju **Diskusija** detaljno su analizirani rezultati dobijeni određivanjem antioksidativne i antibakterijske aktivnosti ispitivanih 4-fenil hidrosikumarina, kao i rezultati kompjuterskih studija. Utvrđeno je da je *orto* raspored hidroksilnih grupa kod 7,8S

odgovoran za njegovu najizraženiju antioksidativnu aktivnost. Analiza kompjuterski izračunatih parametara ispitivnih molekula ukazuje da je HAT termodinamički dominantan mehanizam antioksidativnog delovanja u vakuumu, dok je u ostalim sredinama (n-oktanol, etanol i voda) najverovatniji SPLET mehanizam. Studije molekuskog dokinga su odredile afinitet vezivanja ispitivanih molekula za aktivna mesta karakterističnih enzima i doprinele razjašnjenju odnosa njihove antibakterijske aktivnosti. QSAR model zasnovan na Monte Karlo metodi se pokazao kao validan za izračunavanje anti-HIV aktivnost kumarinskih molekula.

U poglavlju **Zaključak** sumirani su dobijeni rezultati. Korišćenje *in vitro* eksperimentalnih metoda za određivanje antioksidativne i antibakterijske aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina u kombinaciji sa kompjuterskim studijama zasnovanim na DFT metodi, molekuskom dokingu i uspostavljanje QSAR modela zasnovanog na Monte Karlo metodi pokazali su se kao efikasan pristup za utvrđivanje i razjašnjavanje farmakohemijskih aspekata delovanja ispitivanih jedinjenja.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 165 referenci koje su korišćene u izradi ove doktorske disertacije, pri čemu je značajan udeo literature novijeg datuma.

4. Ocena naučnog doprinosa doktorske disertacije

Doktorska disertacija dipl. farmaceuta Jovane Veselinović pod naslovom „Farmakohemijski aspekti delovanja odabranih 4-fenil hidroksikumarina – integrisana *in vitro* i kompjuterska studija“ predstavlja originalan i samostalan naučni rad sa multidisciplinarnim pristupom ispitivanom problemu jer su korišćena najsavremenija saznanja i metodologija iz oblasti Farmaceutske hemije, Biohemije, Mikrobiologije i Toksikologije. Dobijeni rezultati su omogućili ne samo razjašnjenje mehanizama antioksidativnog i antibakterijskog delovanja ispitivanih jedinjenja, već i predviđanje mogućnosti modifikacije ovih i sličnih molekula u cilju poboljšanja njihove aktivnosti.

5. Primenljivost i korisnost rezultata

Imajući u vidu značajnu ulogu oksidativnog stresa u nastanku i razvoju mnogih oboljenja veliki je značaj utvrđivanja mehanizama antioksidativne aktivnosti različitih prirodnih i sintetskih antioksidanasa. Ispitivanje mehanizama antibakterijske aktivnosti može da doprinese razvoju novih antibakterijskih lekova što je od izuzetnog značaja jer je pojava rezistencije bakterija na postojeće antibakterijske lekove jedan od najvećih problema savremene medicine. U oba ova segmenta rezultati ove doktorske disertacije daju značajan doprinos.

6. Način prezentovanja rezultata široj naučnoj javnosti

Deo rezultata doktorske disertacije dipl. farmaceuta Jovane Veselinović objavljen je u dva rada u časopisima sa SCI liste i u jednom radu u domaćem časopisu. Predviđeno je i dalje publikovanje radova sa preostalim rezultatima.

Na osnovu iznetih podataka Komisija donosi sledeći

ZAKLJUČAK

Doktorska disertacija dipl. farmaceuta Jovane Veselinović pod naslovom „Farmakohemijski aspekti delovanja odabranih 4-fenil hidroksikumarina – integrisana *in vitro* i kompjuterska studija“ je izrađena u skladu sa savremenim principima naučno-istraživačkog rada i predstavlja aktuelan i naučno zasnovan rad. Kandidat je pokazao sposobnost za koncipiranje istraživanja, korišćenje adekvatne metodologije rada i literature, kao i sposobnost za interpretaciju rezultata. Sadržaj sprovedenog istraživanja u potpunosti odgovara ciljevima koji su postavljeni prilikom odobrenja teme, analiza rezultata i zaključci su jasni, a dobijeni rezultati su korisni i primenljivi. Deo dobijenih rezultata je već prezentovan široj naučnoj javnosti u obliku odgovarajućih publikacija.

Komisija smatra da je doktorska disertacija dipl. farmaceuta Jovane Veselinović originalan naučni rad i predlaže Nastavno-naučnom veću medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu da usvoji pozitivnu ocenu izrađene doktorske disertacije i odobri njenu javnu odbranu.

KOMISIJA

Prof. dr Srđan Pešić, predsednik

Prof. dr Goran Nikolić, mentor i član

Prof. dr Gordana Kocić, član

Prof. dr Dušica Stojanović, član

Prof. dr Tatjana Mihajilov-Krstev, član
sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu

U Nišu, 01.09.2014. godine

Glavni naučni doprinos doktorske disertacije

Osnovni naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u kombinovanju *in vitro* eksperimentalnih metoda za određivanje antioksidativne i antimikrobne aktivnosti odabranih 4-fenil hidrosikumarina i kompjuterske studije zasnovane na primeni DFT metode, molekuskog dokinga i generisanju QSAR modela za proučavanje aktivnosti ispitivanih molekula. Dobijeni rezultati omogućili su bolje razumevanje mehanizama antioksidativnog i antimikrobnog delovanja ispitivanih supstanci, ali se mogu primeniti i u širem kontekstu. Multidisciplinarni pristup primenjen u ovoj disertaciji moguće je primeniti i za ispitivanje različitih aktivnosti drugih supstanci kao i za predviđanje aktivnosti supstanci koje još nisu sintetisane što se može iskoristiti i za dizajn novih lekova.

Major scientific contribution of PhD thesis

Major scientific contribution of this PhD thesis is the combination of *in vitro* experimental methods for the determination of antioxidant and antibacterial activities of selected 4-phenyl hydroxycoumarins with computer study based on the application of DFT method, molecular docking and construction of QSAR models for investigating activities of studied molecules. Results obtained in this thesis enabled better understanding of mechanisms of antioxidant and antibacterial activities of studied compounds but may be used also in wider context. Multidisciplinary approach used in this PhD thesis can be applied for studying various activities of other substances as well as for the prediction of activities of substances which are not yet synthesized and this may be used for new drugs design.

Objavljeni radovi doktoranta sa SCI liste iz teme doktorske disertacije:

1. **Veselinović JB**, Veselinović AM, Vitnik ŽJ, Vitnik VD, Nikolić GM. Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated *in vitro* and computational studies. Chem-Biol Interact 2014; 214: 49-56.
2. **Veselinović JB**, Veselinović AM, Nikolić GM, Pešić SZ, Stojanović DB, Matejić JS, Mihajilov-Krstev TM. Antibacterial potential of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: integrated *in vitro* and molecular docking studies. Med Chem Res Article in Press DOI: 10.1007/s00044-014-1245-0.

Ukupan broj publikovanih radova doktoranta: 7 (sedam)