

ПРИМ. БР.	20.03.2024	ФАКУЛТЕТ
ОБЈ. БР.	05 2421	

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

■

**ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ**

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 19.2.2024. године (број одлуке: IV-03-90/19) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација”, кандидата **Николе Недељковића**, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука, за коју су именовани коментори **Милош Николић**, ванредни професор и **Владимир Добричић**, ванредни професор.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације:
Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикона, једначина и референци) (до 500 карактера):
Докторска дисертација је написана на 127 страна, подељена на седам поглавља, цитирана је 261 референца, резултати су представљени кроз 33 слике, 20 табела и 3 схеме, а наведене су и 22 једначине. Циљ студије је био да се функционализацијом карбоксилне групе напроксена у тиоуреидну групу применом стерно волуминозних и липофилних ароматичних амина и естара ароматичних аминокиселина синтетишу нови молекули који потенцијално имају исту или снажнију антиинфламацијску и цитотоксичну активност у односу на напроксен.
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):
Наведена докторска дисертација је спроведена са циљем да се применом одговарајуће хемијске реакције синтетишу једињења која ће показати исту или бољу антиинфламацијску и цитотоксичну активност у односу на полазни напроксен. Поред биолошке анализе, планирано је испитивање параметара липофилности, степена пасивне гастроинтестиналне апсорпције, као и дефинисање структурних карактеристика које имају највећи утицај на пасивну гастроинтестиналну апсорпцију новосинтетисаних једињења.

1.4. Анализа испуњености полазних хипотеза:

Хипотезе истраживања:

1. Реакцијом напроксена, калијум-тиоцијаната и једињења са аминоксидом (естри ароматичних аминокиселина и ароматични амини) настају тиоуреидни деривати напроксена. У овој докторској дисертацији синтетисано је укупно 14 тиоуреидних деривата напроксена и то 10 деривата ароматичних амина и четири деривата естара ароматичних аминокиселина.

2. RP-TLC и RP-HPLC представљају поуздане замене за традиционалну shake-flask методу при одређивању параметара липофилности новосинтетисаних једињења.

Резултати ове докторске дисертације показују да су RP-TLC и RP-HPLC методе погодније за процену липофилности синтетисаних једињења у односу на традиционалну shake-flask методу, због велике липофилности испитиваних једињења, услед чега готово целокупна количина испитиване супстанце прелази у органску фазу што онемогућава адекватно спектрофотометријско израчунавање коефицијента расподеле. Међу испитиваним дериватима напроксена највеће вредности RP-TLC и RP-HPLC хроматографских параметара поседују дериват етилестра фенилаланина (дериват 6) и метилестра N-метил триптофана (дериват 7). С обзиром на то да синтетисана једињења не поседују јонизујуће центре, $\log P$ је једнак $\log D$ вредности при свим рН вредностима.

3. Од структуре изабраних естара аминокиселина и ароматичних амина, који ће бити употребљени у синтези, зависи степен пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних једињења.

Резултати процене пасивне гастроинтестиналне апсорпције који су добијени у склопу ове докторске дисертације показују да анализирана једињења поседују значајно мањи потенцијал да прођу кроз гастроинтестиналну мембрану у односу на напроксен без обзира на извршену хемијску модификацију, при чему је само дериват 7 показао већи степен пермеабилности у односу на напроксен. Резултати QSPR анализе су показали да су два дескриптора која најбоље описују однос структуре и пермеабилности испитиваних једињења *SM07_EA(dm)* и *CATS3D_02_AL*. Анализом QSRR модела закључено је да *Mor20u* дескриптор најбоље описује повезаност између структуре испитиваних једињења и њихове ретенционе способности у ВМС систему. РАМРА и ВМС анализа указују на висок степен усаглашености резултата ова два модела, јер су оба показала да тиоуреидни деривати напроксена са естрима ароматичних аминокиселина (деривати 6 и 7) поседују највећи, а дериват 5 најмањи потенцијал за пасивну гастроинтестиналну апсорпцију

4. Неки од новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена показују снажнији антиинфламацијски ефекат у поређењу са напроксеном.

Синтетисана једињења 2, 4 и 7 показала су најснажнији потенцијал редукције едема шапе пацова у највећој дози, који је знатно већи у односу на нетретирану групу пацова, а упоредив са активношћу напроксена. Максимум антиинфламацијског ефекта уочен је у периоду најизраженијег едема током трећег и четвртог сата након апликације карагенана, па се претпоставља да је најинтензивнија инхибиција едема шапе током одложене фазе инфламације последица утицаја синтетисаних једињења на биосинтезу простагландина.

5. Неки од новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена показују снажнији цитотоксични ефекат према туморским ћелијским линијама у односу на ћелије хуманог фибробласта.

Резултати студија цитотоксичности показали су да ниједно од синтетисаних једињења не поседује значајан цитотоксични ефекат на вијабилност ћелија фибробласта MRC-5 и веома благ ефекат на MDA-MB-231 ћелијску линију.

6. Неки од новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена индукују апоптозу туморских ћелија.

Резултати испитивања цитотоксичности показују да су најизраженији ефекат остварили деривати 3 и 8 и то на HeLa туморску ћелијску линију грлића материце уз доказану активацију екстринзичког апоптотског пута.

1.5. Анализа примењених метода истраживања:

Методолошки приступ истраживањима у оквиру ове докторске дисертације је одговарајући и у потпуности усаглашен са постављеним циљевима и хипотезама. Синтеза је спроведена применом тростепене процедуре у којој киселински хлорид напроксена, добијен у првом кораку, у присуству калијум-тиоцијаната реагује са ароматичним аминима и естрима ароматичних аминокиселина формирајући жељени производ. Добијени производи су пречишћени применом препаративне хроматографије на танком слоју. Као мобилна фаза за препаративну TLC коришћен је хлороформ (за пречишћавање деривата ароматичних амина) и смеша хлороформ/метанол у односу 99:1 v/v (за пречишћавање деривата естара ароматичних аминокиселина). Једини изузетак представљало је пречишћавање једињења 11, где је као мобилна фаза коришћен систем дихлорметан/метанол у односу 99:1 v/v. Структурна карактеризација спроведена је применом методе одређивања тачке топљења и тачних маса, затим NMR (^1H и ^{13}C), IR и масене спектроскопије. За *in silico* израчунавање липофилности коришћено је неколико софтверских пакета како би се одредило осам различитих параметара липофилности (iLogP, xLogP3, wLogP, mLogP, SILICOS-IT, Consensus logP, MarvinSketch (logP)) које су касније корелисане са експериментално одређеним параметрима липофилности у циљу утврђивања модела који најпоузданије може предвидети липофилност испитиваних једињења. Одређивање партиционог коефицијента напроксена је спроведено применом традиционалне *shake-flask* методе у систему растварача (*n*-октанол/вода (pH=3) у односу 1:300 v/v). У издвојеној фази *n*-октанола анализирана је концентрација напроксена мерењем апсорбације на таласној дужини $\lambda=332$ nm применом UV/VIS BioTech Epoch Microplate спектрофотометра (California, САД). За одређивање липофилности испитиваног једињења коришћен је систем растварача (*n*-октанол/вода у односу 1:500 v/v), при чему је након раздвајања фаза, коришћен горепоменути спектрофотометар за мерење апсорбације испитиване супстанце која се налази у *n*-октанолу на таласној дужини $\lambda=320$ nm. Хроматографско понашање новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена и полазног лека испитано је применом реверзно-фазних C-18 силика гел плоча за TLC. Раствори испитиваних једињења припремљени су од претходно направљених штокова чија је концентрација 2 mg/ml, са DMSO као растварачем. Као мобилне фазе коришћени су хроматографски системи сачињени од воде и органских растварача (ацетонитрил, ацетон, тетрахидрофуран, апсолутни етанол и пропанол) у четири различита запреминска односа (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v). Испитивање липофилности RP-HPLC методом спроведено је на Agilent 1200 хроматографу (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, САД) уз употребу Zorbax Eclipse Plus C8 (150 × 4,6 mm, 5 μm) колоне. С обзиром на то да су вредности хроматографских параметара врло сличне без обзира на примењену мобилну фазу, односно, да липофилност једињења није зависна од pH вредности средине, испитивање липофилности свих синтетисаних једињења применом RP-HPLC методе спроведено је уз употребу мобилне фазе ацетонитрил/вода у четири различита запреминска односа (50:50, 60:40, 70:30 и 80:20 v/v). Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције испитиваних једињења извршена је применом PAMPA модела уз употребу смеше хексадекана и хексана (5:95 v/v) (први PAMPA модел), раствора лецитина јајета (1%) (други PAMPA модел) у додекану као вештачком липидном баријером, као и применом BMS модела. QSPR студија је спроведена са циљем испитивања односа logPe вредности добијених PAMPA моделом (зависне варијабле) са израчунатим молекулским дескрипторима (независне варијабле). Избор дескриптора и QSPR анализа синтетисаних једињења извршена је применом софтвера *alvaModel* и *STATISTICA*. Софтвер *alvaModel* коришћен је за формирање PLS, OLS и SVM модела. Софтвер *STATISTICA* је, такође, коришћен за одабир молекулских дескриптора, као и за формирање MLR, PLS и SVM модела. Ретенционо понашање синтетисаних једињења и напроксена анализирано је применом HPLC уређаја Agilent Technologies 1200 Series systems

(Santa Clara, CA, САД) опрењеним бинарном пумпом, мануелним инјектором чија је инјекциона запремина 20 μ l, DAD детектором и уз употребу колоне Zorbax Extend-C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m). *In vivo* испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности 14 новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена спроведено је у Центру за претклиничка и функционална истраживања Факултета медицинских наука у Крагујевцу. У складу са прописима Етичке комисије за добробит лабораторијских животиња Факултета медицинских наука (шифра протокола: 01-10742, датум одобрења: 14.10.2021. године), као и према принципима Добре лабораторијске праксе и Директиве Европског савета (86/609/ЕЕС) дизајниран је протокол истраживања. За спровођење студије акутне оралне токсичности коришћени су здрави мужјаци *Wistar Albino* пацова који су подељени у 15 група (14 једињења + DMSO) од по три животиње чија је телесна тежина била у интервалу 180-200 g. Експерименталну групу чинили су пацови који су *per os* примили испитивана једињења у појединачној дози од 10 mg/kg, док је контролна група обухватила пацове који су *per os* примили једну дозу 1% DMSO. *In vivo* испитивање антиинфламацијске активности новосинтетисаних једињења спроведено је применом модела карагенаном изазваног едема шапе пацова. Инфламација је изазвана интраплантарном применом 1 ml инјекције 0,5% раствора карагенана у физиолошком раствору, која је апликована у леву задњу шапу пацова. Све животиње су подељене у експерименталне и контролне групе. Експериментална група животиња је подељена на подгрупе на основу дозе примењеног тиоуреидног деривата напроксена, док је контролна група животиња подељена у одговарајуће подгрупе у зависности од примењене дозе напроксена као позитивне контроле. COX-2 и 5-LOX инхибиторна активност процењена је применом COX-2 и 5-LOX ензимских флуориметријских китова. Наведени тестови су базирани на флуориметријској детекцији производа каталитичке активности ензима COX-2 (простагландина G2) и интермедијера који је производ активности 5-LOX ензима. Студије молекуског докинга спроведене су у софтверу *OEDocking 3.2.0.2* са алатом за брзо ригидно уклапање. Уклапани конформери су квантификовани коришћењем *Chemgauss4* скоринг функције, док је даља оптимизација конформера извршена применом *OEChemscore* функције вредновања. Испитивање цитотоксичности је спроведено као експериментална *in vitro* студија у којој су коришћене ћелијске линије аденокарцинома дојке (MDA-MB-231), карцинома грлића материце (HeLa), карцинома колоне (HCT 116) и једна малигно неизмењена ћелијска линија фибробласта (MRC-5). Спроведено истраживање је обухватило тестирање степена вијабилности поменутих ћелијских линија у три временска интервала (24, 48 и 72 сата) у присуству растућих концентрација тиоуреидних деривата напроксена. Такође, испитивано је деловање деривата напроксена на релативни однос ћелија у апоптози и некрози на малигним ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), при чему је коришћен анексин V/PI тест, док је однос ћелија у апоптози и некрози детектован проточном цитометријом. У оквиру анализе протеина апоптозе, тестиране су HeLa малигне ћелије карцинома грлића материце, при чему су анализирани протеини активни Вах и Bcl-2, а такође је и мерено присуство активне каспазе-3.

1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

Циљеви ове докторске дисертације били су следећи:

1. Синтетисати тиоуреидне деривате напроксена.
2. Спровести физичко-хемијску карактеризацију новосинтетисаних једињења (структурна анализа и одређивање параметара липофилности).
3. Проценити пасивну гастроинтестиналну апсорпцију новосинтетисаних једињења.
4. Спровести QSPR и QSRR анализу добијених резултата у циљу дефинисања структурних карактеристика новосинтетисаних једињења које имају највећи утицај на пасивну гастроинтестиналну апсорпцију.
5. Испитати *in vivo* антиинфламацијску активност новосинтетисаних једињења.
6. Испитати *in vitro* цитотоксичну активност новосинтетисаних једињења.

Након завршене докторске дисертације сви постављени циљеви докторске дисертације су у потпуности испуњени.

1.7. Анализа добијених резултата истраживања и списак објављених научних радова кандидата из докторске дисертације (аутори, наслов рада, волумен, година објављивања, странице од-до, DOI број¹, категорија):

- У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је укупно 14 тиоуреидних деривата напроксена и то 10 деривата ароматичних амина и четири деривата естара ароматичних аминокиселина уз остварен принос од 25% до 43%.
- Дистрибуција вредности хроматографских параметара RP-TLC и RP-HPLC методе налази се у релативно уском опсегу, што указује на сличну липофилност међу испитиваним једињењима.
- Резултати процене пасивне гастроинтестиналне апсорпције показују да анализирана једињења поседују значајно мањи потенцијал да прођу кроз гастроинтестиналну мембрану у односу на напроксен без обзира на извршену хемијску модификацију, при чему је само дериват 7 показао већи степен пермеабилности у односу на напроксен
- Резултати QSPR анализе су показали да су два дескриптора која најбоље описују однос структуре и пермеабилности испитиваних једињења *SM07_EA(dm)* и *CATS3D_02_AL*.
- ВМС анализа показала је да се од естара ароматичних аминокиселина очекује боља пасивна гастроинтестинална апсорпција у односу на деривате ароматичних амина. Анализом QSRR модела закључено је да је *Mor20u* дескриптор који најбоље описује повезаност између структуре испитиваних једињења и њихове ретенционе способности у ВМС систему.
- Једињења 2, 4 и 7 показала су најснажнији потенцијал да редукују едем шапе пацова у највећој дози, који је знатно већи у односу на нетретирану групу пацова, а компарабилан са активношћу коју је остварио напроксен. Максимум антиинфламацијског ефекта најефикаснијих деривата уочен је у периоду најизраженијег едема током трећег и четвртог сата након апликације карагенана, па се претпоставља да је најинтензивнија инхибиција едема шапе током одложене фазе инфламације последица утицаја синтетисаних једињења на биосинтезу простагландина.
- Резултати испитивања инхибиције COX-2 и 5-LOX ензима показали су да сва синтетисана једињења поседују слабију COX-2 инхибиторну активност у односу на напроксен, што се може објаснити немогућношћу испитиваних једињења да формирају три значајне водоничне интеракције са Arg120 и Tyr355 у активном месту COX-2. Значајна инхибиција 5-LOX ензима забележена за једињења 1-5, при чему је постигнута IC₅₀ вредност деривата 4 најнижа и упоредива са зилеутоном.
- На основу студије молекулског докинга, може се закључити да ниједно од испитиваних једињења не може хелирати јон гвожђа у активном месту 5-LOX, што указује на то да сва синтетисана једињења вероватно спадају у групу нехелирајућих конкуритивних инхибитора овог ензима.
- Студијама цитотоксичности показано је да ниједно од синтетисаних једињења не поседује значајан цитотоксични ефекат на вијабилност ћелија фибробласта MRC-5. Најизраженији цитотоксични ефекат остварили су деривати 3 и 8 на HeLa туморску ћелијску линију грлића материце уз доказану активацију екстринзичког апоптог пута.

Радови:

- **Nedeljković N**, Nikolić M, Čanović P, Zarić M, Živković Zarić R, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, Kočović A, Nikolić M, Jakovljević V, Vujić Z, Dobričić V. Synthesis, Characterization, and Investigation of Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Novel

¹Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceutics*. 2024;16(1):1. (doi: 10.3390/pharmaceutics16010001) (M21)

- **Nedeljković N**, Dobričić V, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, Kočović A, Jeremić N, Novaković J, Jakovljević V, Vujić Z, Nikolić M. Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceutics*. 2023;16(5):666. (doi: 10.3390/ph16050666) (M21)
- **Nedeljkovic N**, Dobricic V, Mijajlovic M, Vujic Z, Nikolic M. Molecular docking analysis of novel thiourea derivatives of naproxen with potential antitumor activity. *Experimental and Applied Biomedical Research*. 2023;24(3):235-42. (doi: 10.2478/sjecr-2021-0037) (M51)

1.8. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области и анализа извештаја о провери докторске дисертације на плагијаризам (до 1000 карактера):

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „Medline“ и „KoBSON“, уз коришћење одговарајућих кључних речи: *Thiourea derivatives of naproxen, lipophilicity, passive gastrointestinal absorption, chemometric analysis, anti-inflammatory activity, COX-2 and 5-LOX inhibition, cytotoxic activity, molecular docking* нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Николе Недељковића под називом „Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација“ представља резултат оригиналног научног рада.

Извештај о плагијаризму показао је минималан степен преклапања и то искључиво на местима која су била неопходна, односно, као последица навођења имена институција, афилијација чланова комисије, методологије која је слична методологији коришћеној у сличним истраживањима, општих стручних имена, фраза и података, карактеризације синтетисаних једињења која је публикована у радовима из доктората, као и библиографских података о коришћеној литератури. У свим осталим деловима научно-истраживачког рада није присутна никаква врста плагијаризма, што је и потврдио софтвер за проверу докторске дисертације на плагијаризам. Резултати изложени у докторској дисертацији су објављени у два рада који су публиковани у часописима М21 категорије. Сходно наведеном, спроведено истраживање представља оригиналан докторски пројекат и резултат је рада докторанда Николе Недељковића.

1.9. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области:

Напроксен је један од најчешће коришћених нестероидних антиинфламацијских лекова који се користи у терапији болова, отока зглобова, као и других симптома артритиса. Међутим, примена напроксена је праћена појавом озбиљних гастроинтестиналних нежељених ефеката, при чему се претпоставља да је за њихову појаву одговорно присуство слободне карбоксилне групе. У складу са поменутом чињеницом хемијска модификација ове функционалне групе могла би бити потенцијално обећавајућа стратегија за превазилажење гастротоксичности. Велики број истраживања у последњој деценији показао је да се дизајн и синтеза деривата напроксена користе у развоју нових високоефикасних антиинфламацијских лекова. Са друге стране, због високог степена генотоксичности и цитотоксичности конвенционалних цитостатика на здраве ћелије, истраживачи су у константној потрази за безбеднијим антитуморским лековима. Највећи број цитостатика према својој хемијској структури представља деривате урее, тиоурее и бензотиазола. Деривати тиоурее чине једну од најперспективнијих класа антитуморских лекова са широком применом против различитих облика леукемије и солидних тумора. Резултати ове докторске дисертације могу да буду од практичне важности у идентификацији нових ефикаснијих нестероидних антиинфламацијских и антитуморских лекова који ће имати већу терапијску

ширину и бољи безбедносни профил од лекова који се већ примењују у клиничкој пракси у терапији различитих инфламацијских болести и карцинома.

1.10. Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):

Завршена докторска дисертација кандидата Николе Недељковића под називом „Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација”, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације. Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану ове докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актима Факултета медицинских наука и општим актима Универзитета у Крагујевцу.

2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација”, кандидата **Николе Недељковића**, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:



Владимир Јаковљевић, редовни професор

Факултет медицинских наука

Универзитет у Крагујевцу

Председник комисије

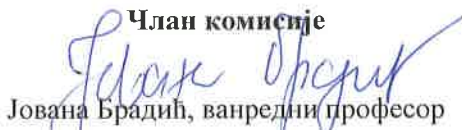


Зорица Вујић, редовни професор

Фармацеутски факултет

Универзитет у Београду

Члан комисије



Јована Брадић, ванредни професор

Факултет медицинских наука

Универзитет у Крагујевцу

Члан комисије