

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj 20.10.2017. godine, donelo je **Odluku (broj 1772/2)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „**Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i ispitivanje antiproliferativne aktivnosti derivata α -tokoferola i γ -tokotrienola**“, kandidata **dipl. farm. Žarka Gagića**, višeg asistenta na Katedri za farmaceutsku hemiju Medicinskog fakulteta – studijski program Farmacija, Univerziteta u Banjoj Luci.

Komisija u sastavu:

- 1. Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor, mentor,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 2. Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor, predsednik komisije,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 3. Dr sc. Branka Ivković, docent,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 4. Dr. sc. Tatjana Srdić-Rajić, viši naučni saradnik,**
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1 PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Žarka Gagića pod nazivom „**Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i ispitivanje antiproliferativne aktivnosti derivata α -tokoferola i γ -tokotrienola**“ napisana je na 153 strane standardnog formata (prored 1,5; font *Times New Roman* - 12). Doktorska disertacija sadrži *Rezime* na srpskom i *Abstract* na engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. Uvod, 2. Cilj rada, 3. Eksperimentalni deo, 4. Rezultati i diskusija, 5. Zaključak, 6. Literatura, 7. Prilozi.**

Disertacija sadrži 35 slika, 8 tabela i 201 literaturni navod.

2 OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj doktorskoj disertaciji sprovedene su studije kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva (*Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR*) derivata vitamina E sa antitumorskom aktivnošću na MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke i određena je struktura farmakofore. Dataset od 30 jedinjenja, sa eksperimentalno određenom antitumorskom aktivnošću na MCF-7 ćelijskoj liniji tumora dojke, je preuzet iz literature i podeljen je na trening i test set.¹⁻⁵ Upotrebom PLS (*Partial Least Squares regression*) statističke metode formirani su 2D-QSAR i 3D-QSAR modeli korišćenjem SIMCA-P⁶ i Pentacle⁷ programa, i izvršena je interna i eksterna validacija modela. Statistički parametri: $R^2=0,798$; $Q^2=0,772$; $R^2_{pred}=0,685$ (2D-QSAR) i $R^2=0,960$; $Q^2=0,830$; $R^2_{pred}=0,649$ (3D-QSAR), kao i dodatni parametri eksterne validacije, su potvrdili pouzdanost i dobru moć predviđanja oba modela.

Za 2D-QSAR model izračunat je domen primenjivosti, pri čemu je utvrđeno da se sva jedinjenja iz test seta nalaze u okviru domena primenjivosti modela, što ukazuje na sposobnost modela da pouzdano predviđa aktivnosti jedinjenja iz test seta. U cilju potvrde da su posmatrane vrednosti dovoljno nezavisne jedna od druge sproveden je test Y-randomizacije. Vrednosti odsečaka za R^2 i Q^2 regresione linije koje prolaze kroz centar

koordinatnog sistema $R^2 = (0,0; 0,123)$ i $Q^2 = (0,0; -0,218)$ potvrdile su da model nije rezultat slučajnih korelacija.

Rezultati 2D-QSAR studije derivata vitamina E su pokazali da povećanje lipofilnosti, molekulske mase i zapremine imaju negativan uticaj na aktivnost, dok uvođenje jednog ili više jonizujućih centara u molekul putem esterifikacije fenolne grupe sa odgovarajućim kiselinama (dikarboksilne kiseline, aminokiseline ili kiseline koje u lancu poseduju jonizujući centar) vodi ka povećanju antitumorske aktivnosti.

3D-QSAR studijom potvrđen je pozitivan uticaj esterifikacije fenolne grupe u položaju C6 hromanskog prstena na antitumorsku aktivnost vitamina E. Pored toga pokazano je i da sledeće strukturne modifikacije dovode do povećanja aktivnosti: najmanje jedan donor i/ili akceptor vodonične veze u estarskom lancu na C6; hidrofobni region u estarskom lancu na C6; dva karbonilna kiseonika na optimalnoj razdaljini od 18,8-19,2 Å ili kraćoj; kraći ili sterno drugačiji ugljovodonični lanac na položaju C2.

Upotrebom modifikovanog Steglich-ovog metoda esterifikacije izvršena je sinteza estara α -tokoferola sa lizinom, prolinom, glutaminom, asparaginom i estara γ -tokotrienola sa lizinom, prolinom, glutaminom.⁸ U prvoj fazi, korištenjem EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid)/DMAP (*N,N*-Dimetilpiridin-4-amin) uslova reakcije pripremljeni su estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa Cbz (benziloksikarbonil) zaštićenim aminokiselinama. U drugoj fazi, zaštitne Cbz grupe su uklonjene katalitičkom hidrogenacijom uz primenu Pd/C (paladijum na ugljeniku) kao katalizatora. Estri sa lizinom su izolovani u vidu hidrohloridnih soli dok su estri sa ostalim aminokiselinama izolovani kao slobodni amini.

Optimizovani su hromatografski uslovi (TLC, HPLC, hromatografija na koloni) za praćenje sinteze i prečišćavanje proizvoda. Sintetisana jedinjenja su identifikovana i strukturno okarakterisana upotrebom ^1H NMR, ^{13}C NMR, ATR-FTIR, MS TOF i MS-MS spektroskopskih metoda.

Uticaj sintetisanih jedinjenja, komercijalnog α -tokoferil sukcinata (α -TOS) i prirodnog γ -tokotrienola na preživljavanje tumorskih ćelija ispitan je *in vitro* na MCF-7, MDA-MB 231 ćelijskim linijama tumora dojke, A549 ćelijskoj liniji tumora pluća i MRC-5 normalnoj ćelijskoj liniji fetalnih fibroblasta pluća. Upotrebom MTT-testa određene su minimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}).

Od 7 sintetisanih estara, najveći uticaj na preživljavanje malignih ćelija su imali α -tokoferil lizin, α -tokoferil asparagin i γ -tokotrienil lizin, sa IC_{50} vrednostima nižim od 30 μ M na ćelijskim linijama na kojima su ispoljili antiproliferativnu aktivnost. γ -Tokotrienil lizin je jedini od ispitivanih jedinjenja koji je ispoljio aktivnost na sve tri tumorske ćelijske linije sa IC_{50} vrednostima 20,6 μ M (MCF-7), 28,6 μ M (MDA-MB-231) i 19 μ M (A549), ali je α -tokoferil lizin bio aktivniji na MCF-7 (IC_{50} =8,6 μ M) i A549 (IC_{50} =8,6 μ M) ćelijama. Na multirezistentnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji tumora dojke najaču aktivnost je pokazao estar α -tokoferil asparagin nitril (IC_{50} =9,2 μ M). Citotoksični efekat je bio dozno zavisna na sve tri tumorske ćelijske linije. Komercijalni α -TOS i prirodni γ -tokotrienol su ispoljili samo ograničenu antitumorsku aktivnost na svim ćelijskim linijama, sa IC_{50} vrednostima većim od 50 μ M. Estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa prolinom su pokazali umerenu antitumorsku aktivnost na MCF 7 ćelijskoj liniji. Sva sintetisana jedinjenja su pokazala selektivnu toksičnost ka malignim ćelijama, sa slabim uticajem na preživljavanje MRC-5 normalnih ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća.

Uticaj sintetisanih estara vitamina E na ćelijski ciklus tumorskih ćelija ispitan je na multirezistentnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji kancera dojke koja je izložena dejstvu α -tokoferil asparagina, estra koji je ispoljio najsnažniju aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji. U ispitivanje je uključen i doksorubicin da bi se dobile informacije o potencijalnom sinergističkom efektu. Promene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su registrovane citometrijskom analizom.

Nakon 48 sati kontinuiranog tretmana α -tokoferil asparagin je doveo do smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa i izazvao apoptozu ćelija sa jasnim izdvajanjem sub-G1 pika. Doksorubicin takođe uvodi ćelije u apoptozu, sa izdvajanjem karakterističnog sub-G1 pika, a doveo je i do značajnog smanjenja udela ćelija u S i G2/M fazi. Kombinacija α -tokoferil asparagina sa doksorubicinom dovela je do izraženog nakupljanja ćelija u sub-G1 fazi, što je ukazalo na apoptozu kao primarni mehanizam antitumorske aktivnosti.

Sposobnost α -tokoferil asparagin estra da izazove programiranu ćelijsku smrt MDA-MB-231 ćelija ispitana je upotrebom metode dvokolornog bojenja sa Annexin V-FITC i propidijum jodidom. MDA-MB-231 ćelije su tretirane α -tokoferil asparaginom, doksorubicinom i njihovom kombinacijom tokom 48 sati. Rezultati su pokazali da je α -tokoferil asparagin indukovao apoptozu pri čemu je 13,56% ćelija bilo u stadijumu rane apoptoze a 15,95% ćelija u stadijumu kasne apoptoze ili nekroze. Doksorubicin je primarno doveo do povećanja procenta kasnoapoptotičnih/nekrotičnih ćelija. Tretman MDA-MB-231

ćelija kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin je doveo do masovne apoptoze sa procentom ćelija u ranom stadijumu apoptoze od 50,25%, ukazujući na sinergističko dejstvo i mogućnost kombinovane terapije.

Budući da enzimi prisutni u krvi mogu dovesti do hidrolize estara, testirana je stabilnost α -tokoferil asparagina i komercijalnog α -TOS u sveže pripremljenoj humanoj plazmi. Plazma je opterećena sa ispitivanim jedinjenjima i termostatirana na 37 °C, a merenja su vršena upotrebom HPLC metode. Nakon 6 h inkubacije detektovano je približno 83% od početne koncentracije α -tokoferil asparagina u plazmi, odnosno 39% nakon 24 h, ukazujući na prihvatljivu metaboličku stabilnost α -tokoferil asparagina i srodnih estara vitamina E.

Da bi identifikovali nova vodeća jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću upotrebom FLAP softvera⁹ sproveden je protokol virtuelnog skrininga. Pretraživanjem ChEMBL baze bioaktivnih jedinjenja (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) metodom virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi α -tokoferil lizina i α -tokoferil asparagina, kao najaktivnijih liganada na MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama kancera dojke, identifikovano je po 5 jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću na navedenim ćelijskim linijama. Pretraživanjem literature nađeno je da je za veliki broj ovih jedinjenja ranijim studijama eksperimentalno određena antitumorska aktivnost na različitim malignim ćelijskim linijama (MCF-7, KB, NSCLC-N6, HT-29, ARPE19, SK-MEL-2, BRO, P388), potvrđujući na taj način validnost formiranog skrining modela.

Na osnovu informacija dobijenih iz 2D/3D-QSAR studija o najvažnijim strukturnim karakteristikama koje su bitne za dejstvo, dizajnirano je 9 novih jedinjenja. Antitumorske aktivnosti ovih jedinjenja na MCF-7 ćelijskoj liniji predviđene su 3D-QSAR modelom. Od 9 dizajniranih jedinjenja, za 4 je predviđena bolja aktivnost od najaktivnijeg jedinjenja iz dataset-a, dok je i za ostalih 5 jedinjenja predviđena visoka aktivnost. Najaktivnija jedinjenja poseduju jedan ili više jonizujućih centara u estarskom lancu, optimalnu lipofilnost, dva karbonilna kiseonika na optimalnoj razdaljini, prisustvo hidrofobnog regiona i prisustvo donora i akceptora vodoničnih veza u estarskom lancu na položaju C6 hromanskog prstena.

Korišćenjem programa ADMET Predictor¹⁰ predviđeni su parametri apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije i toksičnosti dizajniranih jedinjenja i upoređeni sa ADMET (Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Ekskrecija, Toksičnost) parametrima jedinjenja iz dataset-a. Provereno je da li dizajnirana i jedinjenja iz dataset-a zadovoljavaju pravilo Lipinskog, da li postoji rizik od oksidacije enzimima iz grupe citohroma P450 i da li postoji rizik od ispoljavanja toksičnih efekata.

Na osnovu predviđenih pIC_{50} vrednosti na MCF-7 ćelijskoj liniji tumora dojke i predviđenih ADMET osobina, odabrana su dva dizajnirana jedinjenja kao najbolji kandidati za buduću sintezu i biološka istraživanja.

3 UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Osnovna biološka funkcija vitamina E je sprečavanje peroksidacije fosfolipida koji su sastavni deo ćelijskih membrana.¹¹ Zbog svoje sposobnosti da prenose fenolni vodonik na peroksidni radikal tokoferoli (T) i tokotrienoli (T3) predstavljaju najsnažnije prirodne lipidne antioksidanse. Danas se posebna pažnja posvećuje upotrebi vitamina E i njegovih derivata u prevenciji i terapiji malignih oboljenja. Specifične forme vitamina E ispoljavaju snažnu apoptotsku aktivnost protiv različitih tipova tumorskih ćelija, dok ne deluju, ili u maloj meri deluju, na aktivnost zdravih ćelija.^{12,13}

α -T, odnosno njegovi analozi, je najčešće ispitivan izomer u studijama prevencije tumora. Međutim, i pored snažnog antioksidativnog dejstva, literaturni podaci ukazuju da sam prirodni α -T nije jak induktor apoptoze, ali može da ispolji antiproliferativni efekat putem inhibicije ćelijskog ciklusa.¹⁴ Od svih izomera tokoferola, samo je δ -T ispoljio antiproliferativnu aktivnost na humanim MCF-7 i MDA-MB-435 ćelijama tumora dojke.¹⁵ Kasnija studija je pokazala da i γ -T ispoljava antitumorsku aktivnost na ovim ćelijskim linijama indukujući njihovu apoptozu.¹⁶

U svim dosadašnjim studijama dokazan je jači antiproliferativni efekat tokotrienola u odnosu na tokoferole, što se barem delom može objasniti boljim preuzimanjem tokotrienola u ćelije zahvaljujući nezasićenom bočnom lancu.¹⁷ Antiproliferativni efekat tokotrienolima bogate smeše (TRF) je pokazan na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji tumora dojke, pri čemu su od pojedinačnih izomera najaču aktivnost imali γ - i δ -T3.¹⁸ U studiji na mišjim i humanim ćelijskim linijama tumora dojke (sa ili bez prekumerene ekspresije HER2) ispitan je antitumorski efekat α -, γ - i δ -T3 u odnosu na sintetski derivat α -tokoferil sukcinat (α -TOS). I u ovoj studiji najaču aktivnost imali su γ -T3 i δ -T3, koji su smanjili preživljavanje ćelija sa upola manjom IC_{50} vrednošću u odnosu na α -T3 i α -TOS.¹⁹ Ono što je značajno, tokotrienoli nisu ispoljili citotoksično dejstvo na zdravim epitelnim ćelijama dojke.²⁰ Prirodni γ -tokotrienol je pokazao slabu aktivnost na MCF-7, MDA-MB-231 ćelijama tumora dojke i A549 ćelijama tumora pluća sa $IC_{50} > 50 \mu M$.

Od otkrića da prirodni izomeri vitamina E ispoljavaju antitumorsku aktivnost pa do danas, sintetisan je veliki broj analoga od kojih je većina nastala modifikacijom fenolne grupe na hromanskom prstenu, a koji su imali u značajnoj meri poboljšanu aktivnost i farmakokinetičke osobine u odnosu na polazne prirodne proizvode. Najveću grupu analoga vitamina E sa modifikovanom fenolnom grupom na položaju C6 predstavljaju estri, od kojih je najistaknutiji i najviše proučavan α -tokoferil sukcinat (α -TOS). Antitumorska aktivnost α -TOS-a je ispitana na više malignih ćelijskih linija (ćelije tumora dojke, pluća, prostate, želuca, osteosarkoma, mezotelioma, leukemije i druge).²¹⁻²⁷ Literaturni podaci pokazuju da je α -TOS ispoljio antitumorsku aktivnost i u *in vivo* uslovima na modelima miševa, ali samo prilikom intraperitonealne primene. Oralna primena nije imala efekta budući da je dolazilo do hidrolize pod dejstvom crevnih esteraza.²⁸ Sintetisani su analozi α -T sa aminokiselinama glicinom i lizinom, ispitana je njihova antitumorska aktivnost na MCF-7 humanoj ćelijskoj liniji tumora dojke i rezultati su upoređeni sa komercijalno dostupnim derivatima vitamina E (α -T, α -tokoferil acetat, α -TOS i Trolox). Estar α -T sa lizinom je pokazao daleko bolju antitumorsku aktivnost u odnosu na komercijalno dostupne derivate.¹ U okviru ove doktorske disertacije takođe je ispitana *in vitro* antitumorska aktivnost α -tokoferil lizina na MCF-7 ćelijskoj liniji i dobijeni rezultat ($IC_{50}=8,6 \mu M$) je bio u skladu sa rezultatom prethodne studije. Dodatno, α -tokoferil lizin je ispoljio i snažnu antitumorsku aktivnost i na A549 ćelijama tumora pluća ($IC_{50}=10,6 \mu M$). Estar γ -tokotrienola sa lizinom je doveo do smanjenja preživljavanja MCF-7, MDA-MB 231 i A549 ćelija, dok je estar α -tokoferola sa asparaginom snažno inhibisao preživljavanje MDA-MB 231 ćelija.

Predloženo je nekoliko mehanizama kojima bi se mogla objasniti antitumorska aktivnost vitamina E i njegovih analoga: indukcija apoptoze, inhibicija ćelijskog ciklusa, inhibicija biosinteze holesterola i inhibicija angiogeneze. Tretman tumorskih ćelija α -TOS-om uzrokuje promenu u strukturi mitohondrija putem stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (*Reactive Oxygen Species*, ROS) i to u formi superoksida, konverzije sfingomijelina, relokalizacije citohroma c i aktivacije multiplih kaspaza.²⁹ Proapoptotičke karakteristike α -, β -, γ -, δ -tokoferola, α -, γ -, δ -tokotrienola i α -tokoferil acetata su ispitane na MCF-7 i MDA-MB-435 humanim ćelijskim linijama tumora dojke. α -TOS, poznat kao induktor apoptoze u raznim ćelijskim linijama, uključujući i humane ćelije tumora dojke, je poslužio kao pozitivna kontrola. MCF-7 ćelije su se pokazale podložnije apoptozi u odnosu na MDA-MB-435 ćelije.¹⁵ Sintetisani estar α -tokoferola sa asparaginom je doveo do apoptoze MDA-MB-231 ćelija pri čemu je ispoljio snažan sinergistički efekt sa doksorubicinom. Iako je došlo do

značajnog povećanja populacije ranoapoptotičnih ćelija nakon tretmana kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin, populacije kasnoapoptotičnih i nekrotičnih ćelija, kao i ćelijskog debrija su skoro u potpunosti izgubljene. Ova pojava ukazuje na zakašnjenje u aktivaciji apoptotskog izvršnog mehanizma.

Ćelijski ciklus podrazumeva seriju događaja u kojima dolazi do podele matične ćelije na dve ćerke ćelije. Sistem koji reguliše ćelijski ciklus je poremećen kod tumora pa dolazi do nekontrolisane deobe ćelija. Sam ciklus se može podeliti na osnovne faze:

- G0 – faza mirovanja, ovom fazom započinje ćelijski ciklus.
- G1 – u ovoj fazi dolazi do rasta ćelije.
- S – sinteza, u ovoj fazi dolazi do replikacije DNK.
- G2 – u ovoj fazi ćelija nastavlja da raste.
- M- mitozu, u ovoj fazi dolazi do podele ćelije na dve ćerke ćelije.

Na humanim ćelijama osteosarkoma α -TOS je zaustavio prelazak ćelija iz S u G2 fazu što ih je učinilo osetljivim na metotreksat, antineoplastik čija je aktivnost zavisna od ćelijskog ciklusa, ukazujući na moguću adjuvantnu terapiju.²¹ Inkubacija sa TRF u toku 24 h je rezultovala dozno zavisnim prekidom G0/G1 faze na tri ćelijske linije humanog tumora prostate (LNCaP, DU145 i PC-3), ali ne i na normalnim epitelnim ćelijama.³⁰ Za praćenje ćelijskog ciklusa koristi se metoda protočne citometrije koja prati sadržaj DNK unutar ćelije prilikom njihovog protoka kroz aparat. Ćelije se prethodno tretiraju sa DNK vezujućom fluorescentnom bojom kao što je propidijum jodid (PI), nakon čega se emitovana fluorescencija, koja direktno zavisi od sadržaja DNK, detektuje u aparatu i analizira kompjuterskim softverom. Izlaganje MDA-MB-231 ćelija dejstvu α -tokoferil asparagina dovelo je do povećanja procenta apoptotičnih ćelija sa 1,4% u kontrolnoj grupi na 17,13%, što se na dijagramu distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa uočava kao jasno izdvojen sub-G1 pik. Pored toga, α -tokoferil asparagin je doveo do smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na netretirane ćelije.

S obzirom na prisustvo velikog broja nespecifičnih esteraza, estri vitamina E mogu lako biti hidrolizovani u jetri. Osetljivost α -tokoferil acetata i α -tokoferil asparagina na hepatičku hidrolizu je ispitana u ranijoj studiji koristeći svinjske esteraze jetre.³¹ Utvrđeno je da je poluvreme komercijalnog α -tokoferil acetata oko 1 h, dok se α -tokoferil asparagin pokazao znatno stabilnijim prema hepatičkim enzimima, sa poluvremenom od 6 h. U cilju izbegavanja ekstenzivnog metabolizma estara vitamina E u jetri i postizanja visoke koncentracije u plazmi, predložene su parenteralne formulacije estara vitamina E.^{32,33} Rezultati ispitivanja stabilnosti

α -tokoferil asparagina u plazmi su pokazali da se nakon 6 h koncentracija estera u plazmi smanjila na oko 83% od početne koncentracije odnosno na 69% od početne koncentracije nakon 24 h, ukazujući na prihvatljivu metaboličku stabilnost.

Razvoj kompjuterske hemije i novih računarskih sistema doveo je do selektivnijeg pristupa u razvoju novih lekova. Studije kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (QSAR) podrazumevaju formiranje matematičke veze između biološkog dejstva i kvantitativno definisanih hemijskih karakteristika koje opisuju analiziranu molekulu (deskriptora), unutar seta strukturno sličnih jedinjenja. Ovakva analiza omogućava da se na osnovu informacija o hemijskim karakteristikama relativno malog broja strukturno sličnih jedinjenja predvidi aktivnost mnogo većeg broja jedinjenja i dizajniraju nova jedinjenja sa boljom aktivnošću. Svega nekoliko studija je sprovedeno do danas sa ciljem da se ispita kvantitativna veza između strukture i antitumorskog dejstva derivata vitamina E.^{3,34,35} Na datasetu sastavljenom od estera α -tokoferola sa lizinom, α -tokoferiloksi buterne kiseline, holesteril-sukcinata i holesteriloksi buterne kiseline,¹⁻⁵ koji su ispoljili aktivnost na MCF-7 ćelijskim linijama tumora dojke izvedene su 2D-QSAR i 3D-QSAR studije u okviru ove doktorske disertacije. U 2D-QSAR studiji je pokazano da postoji relativno visok stepen korelacije između parcijalnog naelektrisanja karboksilnog kiseonika i ugljenika kiselinskih estera sa antiproliferativnom aktivnošću, identifikujući slobodnu karboksilnu grupu kao aktivno mesto, dok su parcijalna naelektrisanja na vodoniku i azotu ukazala na amino grupu lizinskih derivata kao značajnu za aktivnost.^{34,35} 3D-QSAR studije su sprovedene na seriji sintetisanih estarskih i karbamatnih analoga α -, γ - i δ -tokotrienola da bi se objasnila snažna antiproliferativna aktivnost najaktivnijih derivata na ćelijskoj liniji tumora dojke. Ovim studijama je pokazano da na aktivnost utiču prisustvo voluminoznog radikala, hidrofobne oblasti koju predstavlja izoprenski bočni lanac, elektronegativnog i elektropozitivnog naelektrisanja u molekuli.³ Nijedna od prethodnih QSAR studija nije izvedena na datasetu koji bi uključivao i derivate tokoferola i tokotrienola, čime bi se dobio detaljan uvid u najvažnije strukturne karakteristike koje su odgovorne za antitumorsku aktivnost široke grupe analoga vitamina E. Integracijom rezultata 2D-QSAR i 3D-QSAR studija na datasetu sastavljenom od derivata tokoferola i tokotrienola koji su ispoljili aktivnost na MCF-7 ćelijskoj liniji dobijeni su podaci da sledeće strukturne modifikacije dovode do poboljšanja antitumorske aktivnosti:

- esterifikacija fenolne grupe na položaju C6;
- najmanje jedan donor i/ili akceptor vodonične veze u estarskom lancu na C6;
- najmanje jedan jonizujući centar u estarskom lancu na C6;

- hidrofobni region u estarskom lancu na C6;
- dva karbonilna kiseonika na optimalnoj razdaljini od 18,8-19,2 Å ili kraćoj;
- kraći ili sterno drugačiji ugljovodonični lanac na položaju C2;
- smanjenje lipofilnosti.

Na osnovu ovih podataka dizajnirana su nova jedinjenja od kojih su 4 imala bolju predviđenu aktivnost od jedinjenja iz dataset-a a dva sa najboljim ADMET osobinama su odabrana kao najbolji kandidati za buduću sintezu i biološka istraživanja.

Virtuelni skrining (VS) se odnosi na grupu *in silico* metoda koje se koriste za pretraživanje ogromnih baza jedinjenja, kako bi bio izabran manji broj kandidata koji će imati najveću verovatnoću da ispoljavaju željenu biološku aktivnost. Kada nije poznato ciljno mesto delovanja jedinjenja ili nije određena kristalografska struktura receptora, ali je poznato jedinjenje sa dokazanom aktivnošću koja se ispituje (npr. citotoksična aktivnost na određenoj vrsti malignih ćelija), moguće je sprovesti virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda (*Ligand-Based Virtual Screening*, LBVS). LBVS se zasniva na principu sličnosti koji kaže da slična jedinjenja ispoljavaju sličnu aktivnost.³⁶ Koristeći kao ligande α -tokoferil lizin koji je aktivan na MCF 7 ćelijskoj liniji i α -tokoferil asparagin nitril koji je aktivan na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, razvijena su 2 LBVS modela i u svakom identifikovano 5 jedinjenja sa najvećom verovatnoćom da će ispoljiti aktivnost na ovim ćelijskim linijama. Pretraživanjem literature nađeno je da je za jedinjenje CHEMBL1825079, koje je model predvideo kao potencijalno aktivno na MCF-7 ćelijskoj liniji, ranijom studijom prijavljena antitumorska aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji³⁷, potvrđujući na taj način validnost LBVS modela.

CITIRANA LITERATURA:

1. Arya P., Alibhai N., Qin H. et al. Design and synthesis of analogs of vitamin E: antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, 8, 2433-2438.
2. Djuric Z., Heilbrun L.K., Lababidi S., Everett-Bauer C.K., Fariss M.W. Growth inhibition of MCF-7 and MCF-10A human breast cells by α -tocopheryl hemisuccinate, cholesteryl hemisuccinate and their ether analogs. *Cancer Lett.* **1997**, *III*, 133-139.

3. Elnagar A.Y., Wali V.B., Sylvester P.W., El Sayed K.A. Design and preliminary structure-activity relationship of redox-silent semisynthetic tocotrienol analogues as inhibitors for breast cancer proliferation and invasion. *Bioorg Med Chem.* **2010**, *18*, 755-768.
4. Lee C.L., Chiang L.C., Cheng L.H. et al. Influenza A (H(1)N(1)) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula assa-foetida*. *J Nat Prod.* **2009**, *72*, 1568-1572.
5. Liu L.Y., Li Z.H., Ding Z.H. et al. Meroterpenoid pigments from the basidiomycete *Albatrellus ovinus*. *J Nat Prod.* **2013**, *76*, 79-84.
6. SIMCA-P+ 12.0, Umetrics AB, Umea, Švedska, 2008.
7. Pentacle 1.0.7, Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija, 2013.
8. Neises B., Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew Chem Int Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
9. FLAP 2.1.0, Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija, 2015.
10. ADMET Predictor 6.5, Simulations Plus, Inc., Lancaster, SAD, 2013.
11. Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic Biol Med.* **2014**, *66*, 3-12.
12. Constantinou C., Papas A., Constantinou A.I. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *Int J Cancer.* **2008**, *123*, 739-752.
13. Negis Y., Zingg J.M., Libinaki R., Meydani M., Azzi A. Vitamin E and cancer. *Nutr Cancer.* **2009**, *61*, 875-878.
14. Azzi A., Aratri E., Boscoboinik D. et al. Molecular basis of α -tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *BioFactors.* **1998**, *7*, 3-14.
15. Yu W., Simmons-Menchaca M., Gapor A., Sanders B.G., Kline K. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer.* **1999**, *33*, 26-32.
16. Yu W., Jia L., Wang P. et al. In vitro and in vivo evaluation of anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms. *Mol Nutr Food Res.* **2008**, *52*, 447-456.
17. McIntyre B.S., Briski K.P., Tirmenstein M.A., Fariss M.W., Gapor A., Sylvester P.W. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids.* **2000**, *35*, 171-180.
18. Nesaretnam K., Stephen R., Dils R., Darbre P. Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status. *Lipids.* **1998**, *33*, 461-469.

19. Pierpaoli E., Viola V., Pilolli F., Piroddi M., Galli F., Provinciali M. Gamma- and delta-tocotrienols exert a more potent anticancer effect than alpha-tocopheryl succinate on breast cancer cell lines irrespective of HER-2/neu expression. *Life Sci.* **2010**, *86*, 668-675.
20. Shun M.C., Yu W., Gapor A. et al. Pro-apoptotic mechanisms of action of a novel vitamin E analog (alpha-TEA) and a naturally occurring form of vitamin E (delta-tocotrienol) in MDA-MB-435 human breast cancer cells. *Nutr Cancer.* **2004**, *48*, 95-105.
21. Alleva R., Benassi M.S., Pazzaglia L. et al. Alpha-tocopheryl succinate alters cell cycle distribution sensitising human osteosarcoma cells to methotrexate-induced apoptosis. *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 226-235.
22. Basu A., Grossie B., Bennett M., Mills N., Imrhan V. Alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) modulates human prostate LNCaP xenograft growth and gene expression in BALB/c nude mice fed two levels of dietary soybean oil. *Eur J Nutr.* **2007**, *46*, 34-43.
23. Sun Y., Zhao Y., Hou L., Zhang X., Zhang Z., Wu K. RRR-alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis in human gastric cancer cells via the NF-kappaB signaling pathway. *Oncol Rep.* **2014**, *32*, 1243-1248.
24. Yu W., Sanders B.G., Kline K. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2483-2491.
25. Lee E., Choi M.K., Lee Y.J. et al. Alpha-tocopheryl succinate, in contrast to alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E2 production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis.* **2006**, *27*, 2308-2315.
26. Birringer M., EyTina J.H., Salvatore B.A., Neuzil J. Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure-function relation. *Br J Cancer.* **2003**, *88*, 1948-1955.
27. Tomasetti M., Rippo M.R., Alleva R. et al. Alpha-tocopheryl succinate and TRAIL selectively synergise in induction of apoptosis in human malignant mesothelioma cells. *Br J Cancer.* **2004**, *90*, 1644-1653.
28. Malafa M.P., Fokum F.D., Mowlavi A., Abusief M., King M. Vitamin E inhibits melanoma growth in mice. *Surgery.* **2002**, *131*, 85-91.
29. Weber T., Dalen H., Andera L. et al. Mitochondria play a central role in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate, an agent with antineoplastic activity:

- comparison with receptor-mediated pro-apoptotic signaling. *Biochemistry*. **2003**, *42*, 4277-4291.
30. Srivastava J.K., Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2006**, *346*, 447-453.
 31. Marra F., Ostacolo C., Laneri S. et al. Synthesis, hydrolysis, and skin retention of amino acid esters of α -tocopherol. *J Pharm Sci*. **2009**, *98*, 2364-2376.
 32. Dos Santos G., e Lima R.A., Pestana C. et al. (+) α -Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. *Leukemia*. **2012**, *26*, 451-460.
 33. Weber T., Lu M., Andera L. et al. Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clin Cancer Res*. **2002**, *8*, 863-869.
 34. Nikolic K., Agababa D. Design and QSAR study of analogs of gamma-tocotrienol with enhanced antiproliferative activity against human breast cancer cells. *J Mol Graph Model*. **2009**, *27*, 777-783.
 35. Nikolic K.M. Design and QSAR study of analogs of alpha-tocopherol with enhanced antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *J Mol Graph Model*. **2008**, *26*, 868-873.
 36. Cai C., Gong J., Liu X., Gao D., Li H. Molecular Similarity: Methods and Performance. *Chinese J Chem*. **2013**, *31*, 1123-1132.
 37. Carvalho J.F., Silva M.M., Moreira J.N., Simoes S., Sa E.M.M.L. Selective cytotoxicity of oxysterols through structural modulation on rings A and B. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR. *J Med Chem*. **2011**, *54*, 6375-6393.

4 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **Gagic Z**, Nikolic K, Ivkovic B, Filipic S, Agbaba D. QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with enhanced antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cells. *JTICE*. **2016**, *59*, 33-44. (M21)
2. **Gagic Z**, Ivkovic B, Srdic-Rajic T, Vucicevic J, Nikolic K, Agbaba D. Synthesis of the vitamin E amino acid esters with an enhanced anticancer activity and *in silico* screening for new antineoplastic drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *88*, 59-69. (M21)

Spisak radova objavljenih u nacionalnim časopisima:

1. **Gagić Ž**, Ivković B, Nikolić K, Agbaba D. Primena metoda tankoslojne hromatografije i hromatografije na koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estra. *Arh. Farm.* **2014**, *64*, 261–270. (M53)

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34):

1. **Gagic Z**, Ivkovic B, Vucicevic J, Agbaba D, Nikolic K. The synthesis of amino acid analog of vitamin E. *12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, 2014. Proceedings, pp. 1149-1152.
2. **Gagić Ž**, Nikolić K, Agbaba D, Ivković B. QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with antiproliferative effect on MCF-7 breast cancer cells. *VI Serbian Congress of Pharmacy with international participations*, Belgrade, 2014. Abstract book, pp. 166.
3. **Gagić Ž**, Nikolić K, Ivković B, Filipić S, Agbaba D. Primena hromatografskih metoda u sintezi α -tokoferil-lizin estra. *III Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem*, Sarajevo, 2015. *Pharmacia*, Vol.18(1): pp. 165.
4. **Gagić Ž**, Nikolić K, Ivković B, Filipić S, Agbaba D. Monitoring the synthesis and purification of amino acid ester of α -tocopherol. *21st International Symposium on Separation Sciences*, Ljubljana, 2015. Book of Abstracts, pp. 78.
5. **Gagić Ž**, Nikolić K, Ivković B, Filipić S, Agbaba D. Design of new vitamin E derivatives as potential anticancer agents. *II Congress of pharmacists of Montenegro with the international participation*, Budva, 2015. Abstract book, pp. 123-124.

5 ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Ovu doktorsku disertaciju čine tri celine čiji će rezultati imati potencijalni značaj za primenu derivata vitamina E u terapiji malignih bolesti.

Prva celina obuhvata 2D-QSAR i 3D-QSAR studije derivata vitamina E sa aktivnošću na MCF-7 ćelijama tumora dojke i određivanje strukture farmakofore. Dataset je formiran od derivata tokoferola i tokotrienola čime je postignut strukturni diverzitet, a takođe je obuhvaćen širok opseg aktivnosti. Značaj dobijenih QSAR modela ogleda se u mogućnosti predviđanja antitumorske aktivnosti sličnih derivata vitamina E bez potrebe za *in vitro* ispitivanjima. Oba modela su podvrgnuta strogoj internoj i eksternoj validaciji čime je potvrđena njihova pouzdanost i dobra moć predviđanja. Sprovedene QSAR studije omogućuju i određivanje strukture farmakofore derivata vitamina E, odnosno definisanje najvažnijih strukturnih delova molekule koji imaju pozitivan ili negativan uticaj na aktivnost. Tako su rezultati 2D-QSAR studije pokazali da esterifikacija fenolne grupe dihidrohromanskog prstena sa kiselinama koje poseduju minimalno jedan jonizujući centar (kao što su aminokiseline) dovodi do povećanja antitumorske aktivnosti, dok povećanje lipofilnosti ima negativan uticaj na aktivnost. 3D-struktura farmakofore najaktivnijih jedinjenja uključuje prisustvo dva akceptora vodoničnih veza predstavljena sa dva karbonilna kiseonika na optimalnom rastojanju, prisustvo hidrofobnog regiona, akceptora i donora vodonične veze u estarskom lancu na položaju C6 dihidrohromanskog prstena.

Drugu celinu čini sinteza estara α -tokoferola sa aminokiselinama lizinom, prolinom, glutaminom, asparaginom i estara γ -tokotrienola sa lizinom, prolinom, glutaminom. Novosintetisani derivati su fizičko-hemijski okarakterisani i *in vitro* je ispitana njihova biološka aktivnost na MCF-7 i MDA-MB 231 ćelijskim linijama tumora dojke i A549 ćelijskoj liniji tumora pluća. Dobru aktivnost pokazao je estar α -tokoferola sa lizinom i to na MCF-7 i A549 ćelijama, dok se estar γ -tokotrienola pokazao aktivan na sve tri ćelijske linije, što predstavlja dobru osnovu za dalja pretklinička ispitivanja ovih estara. Naročito značajan rezultat pokazao je estar α -tokoferola sa asparaginom koji je ispoljio snažnu aktivnost na MDA-MB 231 ćelijskoj liniji. Ove ćelije predstavljaju veliki problem u tretmanu tumora dojke budući da pokazuju rezistenciju na veliki broj lekova. Daljim ispitivanjem ćelijskih mehanizama koji leže u osnovi ovakvog dejstva utvrđeno je da α -tokoferil asparagin dovodi do apoptoze i modifikacije ćelijskog ciklusa MDA-MB 231 ćelija. Pritom je pokazano da u

oba slučaja postoji sinergistički efekat sa doksorubicinom, što otvara mogućnost kombinovane terapije i korištenja manjih doza doksorubicina koje bi dovele do manjeg broja neželjenih efekata. Studija stabilnosti u humanoj plazmi ukazala je na prihvatljivu metaboličku stabilnost α -tokoferil asparagina, na osnovu čega se može zaključiti da će nakon parenteralne aplikacije ovaj estar kao i srodni estri vitamina E biti stabilni dovoljno dugo da bezbedno stignu do tumorskih tkiva i ispolje dejstvo. Dobijeni rezultati predstavljaju adekvatne smernice za dalja *in vivo* ispitivanja α -tokoferil asparagina. Nijedno od novosintetisanih jedinjenja koja su ispoljila aktivnost na tumorskim ćelijama nije bilo toksično prema zdravim ćelijama humanih fibroblasta pluća.

Na osnovu strukture α -tokoferil lizina i α -tokoferil asparagina kao najaktivnijih jedinjenja na MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijama, virtuelni skrining je identifikovao 10 jedinjenja sa visokim potencijalom za ispoljavanje antitumorske aktivnosti na ovim ćelijskim linijama. Na ovaj način, odabirom manjeg broja tzv. vodećih (*lead*) molekula za sintezu i dalja eksperimentalna testiranja, potencijalno se ostvaruje velika ušteda u vremenu i novcu i povećava šansa da kandidat dospe do prekliničkih odnosno kliničkih studija.

Treću celinu predstavlja dizajn novih analoga vitamina E sa potencijalno snažnijim antitumorskim dejstvom na MCF-7 tumorskim ćelijama. Integrisanjem informacija o strukturnim karakteristikama bitnim za antitumorsku aktivnost dobijenih iz 2D- i 3D-QSAR studija, dizajnirani su novi aktivniji analozi vitamina E. Vrednosti *in silico* izračunatih ADMET parametara dizajniranih jedinjenja su upotrebljene za finalni odabir dva kandidata sa najvišom predviđenom antitumorskom aktivnošću, dobrom metaboličkom stabilnošću i niskom toksičnošću, koji su predloženi za buduću sintezu i ispitivanja na MCF-7 ćelijama tumora dojke.

Predlog Komisije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat dipl. farm. Žarko Gagić uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutske-medicinske hemije i strukturne analize.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 1 radu u časopisu nacionalnog značaja (M53) i 5 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dipl. farm. Žarka Gagića i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i ispitivanje antiproliferativne aktivnosti derivata α -tokoferola i γ -tokotrienola ”

Članovi Komisije:

1. _____

Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor, mentor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____

Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor, predsednik komisije,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____

Dr sc. Branka Ivković, docent,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____

Dr. sc. Tatjana Srđić-Rajić, viši naučni saradnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

U Beogradu, 11.12.2017.