



ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени подобности студента, теме и ментора за израду докторске дисертације

1. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ		
Орган који је именовано комисију: Научно - наставно вијеће Медицинског факултета		
Датум именовања комисије: 13.02.2024.		
Број одлуке: 18/3.93/24		
Чланови комисије:		
1. Шкрбић Ранко Презиме и име	Редовни професор Звање	Фармакологија Научно поље и ужа научна област
Медицински факултет, Универзитет у Бањој Луци Установа у којој је запослен-а		Предсједник комисије Функција у комисији
2. Тубић Биљана Презиме и име	Ванредни професор Звање	Фармацеутска хемија Научно поље и ужа научна област
Медицински факултет, Универзитет у Бањој Луци Установа у којој је запослен-а		Члан комисије Функција у комисији
3. Вељовић Елма Презиме и име	Ванредни професор Звање	Фармацеутска хемија Научно поље и ужа научна област
Фармацеутски факултет, Универзитет у Сарајеву Установа у којој је запослен-а		Члан комисије Функција у комисији

2. ПОДАЦИ О СТУДЕНТУ					
Име, име једног родитеља, презиме: Ђорђе (Бране и Дијана) Ђукановић					
Датум рођења: 06.10.1995. године					
Мјесто и држава рођења: Бања Лука, БиХ (РС)					
2.1. Студије првог циклуса или основне студије или интегрисане студије					
Година	2014	Година	2019	Просјечна	9,64

уписа:		завршетка:		оцјена током студија:	
Универзитет: Универзитет у Бањој Луци					
Факултет/и: Медицински факултет					
Студијски програм: Фармација					
Стечено звање: Мастер фармације					
2.2. Студије другог циклуса или магистарске студије					
Година уписа:	/	Година завршетка:	/	Просјечна оцјена током студија:	/
Универзитет: /					
Факултет/и: /					
Студијски програм: /					
Назив завршног рада другог циклуса или магистарске тезе, датум одбране: /					
Ужа научна област завршног рада другог циклуса или магистарске тезе: /					
Стечено звање: /					
2.3. Студије трећег циклуса					
Година уписа:	2020.	Број ECTS остварених до сада:	180	Просјечна оцјена током студија:	9,82
Факултет/и: Медицински факултет					
Студијски програм: Биомедицинске науке					
2.4. Приказ научних и стручних радова кандидата					
РБ	Подаци о референци			Категорија ¹	
1.	Đukanović Đ, Gajić M, Škrbić R. Time-dependent and force-dependent vasoreactivity of isolated human umbilical arteries. <i>Scr Med</i> 2020;51(3):134-40				
Кратак опис садржаја: Описани су различити експериментални услови за спровођење <i>in vitro</i> студија на хуманим умбиликалним артеријама (ХУА) у систему за изоловане органе. Разноликост се огледа у различитој сили затезања препарата и инкубационом периоду. Стога је циљ ове студије био					

¹ Категорија се односи на оне часописе и научне скупове који су категорисани у складу са Правилником о публикавању научних публикација („Службени гласник РС”, бр. 77/10) и Правилником о мјерилима за остваривање и финансирање Програма одржавања научних скупова („Службени гласник РС”, бр. 102/14) односно припадност рада часописима индексираним у свјетским цитатним базама.

да се одреде оптимални експериментални услови за спровођење испитивања на ХУА у систему за изоловане органе. Поређене су КСI индуковане контракције добијене на четири различите силе затезања (0,5 g, 1,0 g, 2,0 g, 4,0g) и три различита инкубациона периода (30 min, 60 min, 120 min). Такође су поређене и dose-response криве за серотонин добијене на различитим препаратима (1,0 g и 60 min са 2,0 g и 120 min). Најснажније контракције изазване серотонином и КСI су забиљежене при експерименталним условима 2,0 g и 120 min. У закључну овог рада предложени су 2,0 g и 120 min као оптимални експериментални услови за извођење in vitro студија на ХУА у систему за изоловане органе.

РБ	Подаци о референци	Категорија
2.	Marinković S, Đukanović Đ, Mandić-Kovačević N, Cvjetković T, Uletilović S, Maksimović ŽM. Preparing a rat brain tissue samples for acetylcholinesterase activity measurement - the MM method. <i>Scr Med</i> 2021; 52(4):266-72.	

Кратак опис садржаја:

Да би се одредила инхибиција АсhЕ активности у мозгу приликом истраживања органофосфатне токсичности неопходно је да се елиминише крв из мозга. Циљ ове студије је био проналазак адекватне методе елиминације крви из мозга без кориштења скупоцјене опреме. Wistar албино пацови су подијељени у 4 групе: параоксон (П), параоксон испирање (ПИ), контрола (К) и контрола испирање (КИ). Групе П и ПИ су примале 25 mg/kg параоксона, а групе К и КИ 1 mL/kg. „Маринковић-Максимовић“ (ММ) метод је изведен на ПИ и КИ групама. Активност АсhЕ је одређивана спектрофотометријски у лизату еритроцита и хомогенату можданог ткива. Макроскопским посматрањем мозга је добра елиминација крви у групама над којима је вршено испирање. Активност АсhЕ је била очекивано мања у П и ПИ групама у поређењу са К и КИ групама. У КИ групи је такође одређена нижа активност АсhЕ у поређењу са К групом. „ММ“ метод омогућује задовољавајућу елиминацију крви из можданог ткива.

РБ	Подаци о референци	Категорија
3.	Đukanović Đ, Bojić MG, Marinković S, Trailović S, Stojiljković MP, Škrbić R. Vasorelaxant effect of monoterpene carvacrol on isolated human umbilical artery. <i>Can J Physiol Pharmacol.</i> 2022; 100(8):755-762	

Кратак опис садржаја:

Карвакрол је главна компонента есенцијалних уља добијених из врста *Thymus* и *Origanum*. Потврђене су различите биолошке активности, укључујући антиоксидативно, противупално, антибактеријско, антигљивично, антитуморско, антинемотодно и вазорелаксантно дејство. Иако је претходно описана вазодилатација изазвана карвакролом, тачан механизам његовог деловања још увек није утврђен. Циљ овог истраживања је био испитати вазореактивност карвакрола на хуманим умбиликалним артеријама и механизам његовог деловања коришћењем методологије купатила за изоловане органе. Карвакрол је узроковао значајан пад васкуларног тонуса артерија прекоонтрахованих са серотонином ($EC_{50} = 442,13 \pm 33,8 \mu\text{mol/L}$). На $300 \mu\text{mol/L}$, карвакрол је спријечио настанак концентрације серотонина. При концентрацији од 1 mmol/L , карвакрол је потпуно блокирао контракцију индуковану BaCl_2 у раствору без Ca^{2+} и контракцију индуковану BAVK 8644 у присуству Ca^{2+} . Изопентенил пиродифосфат, антагонист TRPV3 и TRPA1 канала, смањио је ефикасност карвакрола.

Блокада L-типа Ca^{2+} канала је највероватнији механизам вазорелаксације изазване карвакролом, али мада се улога TRP канала у вазодилатацији посредованој карвакролом не може искључити.

РБ	Подаци о референци	Категорија
4.	Mandić-Kovačević N, Kukrić Z, Latinović S, Cvjetković T, Šobot T, Bajić Z, Maličević U, Marinković S, Đukanović Đ, Uletilović S, Suručić S. Antioxidative potential of pomegranate peel extract: in vitro and in vivo studies. <i>Scr Med.</i> 2023; 54(1):9-18.	

Кратак опис садржаја:

Ово истраживање имало је за циљ да процени антиоксидативни потенцијал екстракта коре нара (PoPEX) поријеклом са југа Херцеговине користећи *in vitro* и *in vivo* методе. PoPEX је анализиран на садржај укупних фенола, флавоноида, флавонола, флаван-3-ола и антоцијана. *In vitro* тестови (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, Briggs-Rauscher, OH радикали и липидна пероксидација) открили су висок садржај фенолних једињења и значајну антиоксидативну активност. *In vivo*, пацови којима је током 7 дана даван PoPEX у дози од 100 mg/kg показали су смањење нивоа TBARS и NO^2 , повећање редукованог глутатиона, те тренд ка смањењу H^2O^2 и O^{2-} вриједности, као и повећање SOD и CAT, иако без статистичке значајности. PoPEX је показао значајан антиоксидативни капацитет у *in vitro* и *in vivo* условима, указујући на његову потенцијалну употребу као додатног суплемента за превенцију инфламаторних стања.

РБ	Подаци о референци	Категорија
5.	Marinković ST, Đukanović Đ, Duran M, Bajic Z, Sobot T, Uletilović S, Mandić-Kovacević N, Cvjetković T, Maksimović ŽM, Maličević U, Vesić N, Jovičić S, Katana M, Šavikin K, Djuric DM, Stojiljković MP, Škrbić R. Pomegranate Peel Extract Attenuates Isoprenaline-Induced Takotsubo-like Myocardial Injury in Rats. <i>Pharmaceutics.</i> 2023; 15(6):1697.	

Кратак опис садржаја:

Ово истраживање је имало за циљ да испита заштитне ефекте коре нара (PoPEX) на изопреналином изазван Takotsubo синдром срчане повреде код пацова. Wistar албино пацови су подијељени у четири групе: претретман PoPEX-ом (PoPEX (P)), PoPEX + изопреналин (P + I), изопреналин (I) и контролна група. Пацови у PoPEX (P) и P + I групама су примали 100 mg/kg/дан PoPEX-а током 7 дана, а затим је изопреналин апликован шестог и седмог дана у P + I групи. Резултати су показали да је претретман PoPEX-ом довео до повећања вриједности супероксид дизмутазе и каталазе, смањења нивоа глутатиона, те смањења реактивних супстанци тиобарбитуратне киселине, H_2O_2 , O_2^- и NO_2 у P + I групи у поређењу са I групом. Претретман PoPEX-ом довео је до значајног смањења вриједности маркера срчаног оштећења, као и укупног обима срчане повреде. Закључак је да претретман PoPEX-ом значајно смањује изопреналиски изазвану Takotsubo срчану повреду, прије свега захваљујући очувању ендогеног антиоксидативног капацитета.

РБ	Подаци о референци	Категорија
----	--------------------	------------

6.	Bajic Z, Sobot T, Uletilovic S, Mandic-Kovacevic N, Cvjetkovic T, Malicevic U, Djukanovic D , Duran M, Vesic N, Avram S, Jovicic S, Katana M, Matavulj A, Ponorac N, Djuric DM, Stojiljkovic MP, Skrbic R. Cardioprotective effects of liraglutide pretreatment on isoprenaline-induced myocardial injury in rats. <i>Can J Physiol Pharmacol</i> . 2023 May 1;101(5):258-267.	
----	---	--

Кратак опис садржаја:

Ова студија истраживала је кардиопротективне ефекте лираглутида, агониста рецептора глукагону сличног пептида-1 (GLP-1RAs), на изопренилином изазвано оштећење миокарда пацова. Четири групе животиња биле су укључене у истраживање. Контролна група примала је физиолошки раствор током 10 дана + физиолошки раствор 9. и 10. дана (контрола), изопренилинска група примала је физиолошки раствор током 10 дана + изопренилин 9. и 10. дана (изопренилинска група), лираглутидска група примала је лираглутид током 10 дана + физиолошки раствор 9. и 10. дана (лираглутидска група), и последња група примала је лираглутид током 10 дана, а изопренилин 9. и 10. дана (лираглутид изопренилин група). Праћени су ЕКГ, биохемијски маркери оштећења миокарда, оксидативни стрес и патохистолошке промјене. Резултати су показали да је лираглутид ублажио изопренилином изазване промјене на ЕКГ-у, те смањио вриједности биохемијских маркера оштећења миокарда, смањио оксидативни стрес, те побољшао липидни профил, указујући на антиоксидативну заштиту и способност лираглутида да ублажи оштећење миокарда изазвано изопренилином.

РБ	Подаци о референци	Категорија
7.	Gajić Bojić M, Đukanović Đ , Marinković S, Jovičić S, Stojiljković MP, Djuric DM, Škrbić R. Methodological challenges in using human umbilical artery as a model for in vitro studies. <i>Exp Physiol</i> . 2023; 108(12):1569-1578	

Кратак опис садржаја:

Узорци хумане умбиликалне артерије (ХУА) су од суштинског значаја за *in vitro* истраживања на изолованим крвним судовима, пружајући увид у промене у утероплацентарној циркулацији. Коришћењем методологије купатила за изоловане органе приказани су корисни експериментални протоколи за испитивања на ХУА. Различити вазоконстриктори (серотонин, простагландин Ф и фенилефрин) и вазодилататори (ацетилхолин и миноксидил) одабрани су за одређивање њихове активности на ХУА. Серотонин је најјачи вазоконстриктор, док су ацетилхолин и фенилефрин изазивали повремено реалаксацију, а повремено контракцију ХУА. Повећање јачине серотонинске контракције и смањење степена вазодилатације узроковане миноксидилом у присуству хомоцистеина указује на његов проконтрактивни ефекат. Коришћењем селективних блокатора утврђено је да K_{ATP} и K_v канали учествују у миноксидилом изазваној вазодилатацији, док L-типа волтажно зависних калцијумских канала игра важну улогу у серотонинској контракцији. Ови протоколи истичу методолошке изазове у припреми ХУА и указују на потенцијалне исходе у интерпретацији васкуларних ефеката проучаваних супстанци, како у физиолошким условима, тако и у моделу пре-еclamпсије изазване хомоцистеином.

РБ	Подаци о референци	Категорија
----	--------------------	------------

8.	Bojić MG, Treven M, Pandey KP, Tiruveedhula VVNPB, Santrač A, Đukanović Đ , Vojinović N, Amidžić L, Škrbić R, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Vascular effects of midazolam, flumazenil, and a novel imidazobenzodiazepine MP-III-058 on isolated rat aorta. Can J Physiol Pharmacol. 2024; 102(3):206-217.	
<p>Кратки опис садржаја:</p> <p>Хипотензивни ефекат бензодиазепина и других лиганата GABA_A рецептора, произилази вјероватно из постојања васкуларних GABA_A рецептора у периферним крвним судовима. Циљ је био додатно објаснити вазодилатацијске ефекте лиганата који делују путем GABA_A рецептора. Коришћењем имунохистохемије, потврђено је присуство GABA_A $\gamma 2$ и $\alpha 1-5$ подјединица на глатким мишићним ћелијама аорте пацов. Испитивала се улога васкуларних GABA_A рецептора помоћу стандардних бензодиазепина, мидазолама и флумазенила, као и новог једињења MP-III-058. MP-III-058 је показао скромно везивање, али значајну функционалну селективност за $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ у односу на друге $\alpha \beta 3\gamma 2$ GABA_A рецепторе. Резултати испитивања на изолованим крвним судовима открили су сличне вазодилатацијске ефекте између MP-III-058 и мидазолама, оба са ефикасношћу сличном празосину при концентрацији од 100 $\mu\text{mol/L}$. Флумазенил је показао слабу вазодилатацијску активност, али је значајно спријечио вазорелаксантне ефекте мидазолама и MP-III-058. Ова истраживања указују на постојање функционалних GABA_A рецептора у аорти пацова, гдје лиганди остварују вазодилатацију позитивном модулацијом бензодиазепинског везног места.</p>		
РБ	Подаци о референци	Категорија
9.	Sobot T, Bajic Z, Skrbic R, Uletilovic S, Mandic-Kovacevic N, Cvjetkovic T, Malicevic U, Djukanovic D , Bojic MG, Jovicic S, Barudzija M, Stojiljkovic MP, Djuric DM. Effect of folic acid on isoprenaline-induced myocardial injury in rats. Physiol Int. 2024. doi: 10.1556/2060.2023.00291. Epub ahead of print. PMID: 38261080.	
<p>Кратки опис садржаја:</p> <p>Оштећење миокарда (MI) изазвано изопренилином (ISO) повезано је са прекомјерном стимулацијом катехоламина, оксидативним стресом, инфламаторним одговором и развојем кардиомиопатије. Фолна киселина (ФА) смањује оксидативни стрес, побољшава ендотелну функцију и спријечава апоптозу, доприносећи заштити кардиоваскуларног система. Циљ истраживања је да испита заштитно дејство претретманом ФА на ISO-индуковано MI код пацова. Током 7 дана, мушки Wistar албино пацови примали су 5 mg/mg/дан ФА. Шестог и седмог дана, MI је индукован применом 85 mg/kg/дан ISO-а. Одређивани су прооксидативни маркери у узорцима плазме, антиоксидативни капацитет у лизатима еритроцита, биохемијски маркери оштећења миокарда, липидни профил, електрокардиографија (ЕКГ) и хистопатолошка анализа. ФА претретман значајно је ублажио промјене изазване ISO-ом; смањило је ниво хомоцистеина и тропонина I високе осетљивости. ФА је умјерено смањила вриједности реактивних кисеоничних врста (O^{2-}, H_2O_2 и TBARS) и побољшала антиоксидативни капацитет. Може се закључити да би ФА, као благи антиоксиданс, могла бити кардиопротективна супстанца у оштећењу миокарда изазваног ISO-ом код пацова.</p>		
<p><i>Оцјена релевантности научне и стручне активности кандидата за предложену тему</i></p>		

дисертације:

Да ли студент испуњава прописане услове?

ДА

НЕ

3. ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Име и презиме: Жарко Гагић

Академско звање: Ванредни професор

Научно поље и ужа научна област: Фармацеутска хемија

Матична институција стицања избора у звање: Медицински факултет, Универзитет у Бањој Луци

Биографија (до 300 ријечи):

Жарко Гагић рођен је 25.8.1984. у Бихаћу. Основну школу и Гимназију завршио је у Бањој Луци. Студијски програм фармација на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци уписао је 2003. године и дипломирао је 2009. године са просјечном оцјеном 9,43. Током студирања био је стипендиста бројних фондација и више пута је награђиван од стране Медицинског факултета за постигнуте резултате. Након завршеног студија обавио је приправнички стаж и положио стручни испит за фармацеуте. Докторске академске студије-модул Фармацеутска хемија завршио је 2018. године на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду, на тему „Одређивање структуре фармакофоре, дизајн, синтеза и испитивање антипролиферативне активности деривата α -токоферола и γ -токотриенола“. Од 2010. године је запослен у звању асистента на Катедри за фармацеутску хемију Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци, од 2014. године у звању вишег асистента, а од 2018. године у звању доцента. Био је ментор и члан комисије за одбрану више од 30 завршних радова студената фармације на Медицинском факултету у Бањој Луци и члан комисије за одбрану докторске дисертације. Од 2020. године обавља функцију руководиоца студијског програма фармација. Учествоје као гостујући наставник на првом и другом циклусу студија фармације на Фармацеутском факултету Универзитета у Тузли. Био је учесник и руководиоца више националних и координатор једног међународног научноистраживачког пројекта. Аутор је и коаутор бројних научних радова штампаних у часописима међународног и националног значаја, саопштења на међународним научним скуповима, поглавља у књизи и научне монографије. Добитник је више награда Медицинског факултета и Универзитета у Бањој Луци за остварене научне резултате. Члан је Комисије за лијекове Агенције за лијекове и медицинска средства Босне и Херцеговине од 2019. године.

Радови из области којој припада приједлог теме докторске дисертације:

РБ	Навести појединачно радове, књиге, поглавља. Додати потребан број редова. Користити исти стил за навођење свих референци.	Категорија
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. J Taiwan Inst Chem Eng. 2016; 59:33-34.	
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.	
3.	Oluić J, Nikolic K, Vucicevic J, Gagic Z , Filipic S, Agbaba D. 3D-QSAR, Virtual Screening, Docking and Design of Dual PI3K/mTOR Inhibitors with Enhanced Antiproliferative Activity. Comb Chem High Throughput Screen. 2017; 20(4):292-303.	
4.	Rogić S, Gagić Ž . 3D-QSAR-based pharmacophore determination and design of novel DPP-4 inhibitors. Scr Med. 2022; 53(4):271-9.	
5.	Jovanović M, Nikolić K, Gagić Ž , Agbaba D. Molecular modeling and analysis of the 3D pharmacophore structure of the selective PI3K- α inhibitors as antitumor agents. Arh. farm. 2018; 68:860-873	
6.	Gagić Ž , Ivković B, Nikolić K, Agbaba D. Application of thin layer and column chromatography in monitoring the synthesis of α -tocopheryl-lysine ester. Arh.farm. 2014; 64: 261-270	
7.	Gagic Z , Ruzic D, Djokovic N, Djikic T, Nikolic K. <i>In silico</i> Methods for Design of Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs. Front Chem. 2020; 7:873	
8.	Djikic T, Gagic Z , Nikolic K. Design and Discovery of Kinase Inhibitors Using Docking Studies. Academic Press. 2021; 337-365	
Да ли ментор испуњава прописане услове?		<u>ДА</u> НЕ

4. ПОДАЦИ О КОМЕНТОРУ

Име и презиме: /		
Академско звање: /		
Научно поље и ужа научна област: /		
Матична институција стицања избора у звање: /		
Биографија ментора/коментора (до 1000 карактера): /		
Радови из области којој припада приједлог теме докторске дисертације: /		
РБ	Навести појединачно радове, књиге, поглавља. Додати потребан број редова. Користити исти стил за навођење свих референци.	Категорија
1.	/	/

2.	/	/
3.	/	/
4.	/	/
5.	/	/
Да ли коментор испуњава прописане услове?		ДА НЕ

5. ОЦЈЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ		
5.1. Формулација назива дисертације (наслова)		
Значај TRPA1 канала као циљног мјеста вазодилаторног дејства карвакрола и примјена <i>in silico</i> метода у дизајну нових молекула са вазодилаторним дејством		
Да ли је наслов тезе подобан?	ДА	НЕ
5.2. Научно поље и ужа научна област		
Фармацеутска хемија		
Да ли су научно поље и ужа научна област исти као код ментора/коментора?	ДА	НЕ
5.3. Предмет истраживања		
<p>Међу хроничним незаразним болестима, кардиоваскуларна обољења један су од главних узрочника смртности у развијеним земљама. Према подацима Свјетске здравствене организације 54 % случајева можданих удара и 47 % случајева исхемијске болести срца директна је последица хипертензије као примарног обољења, због чега она спада у водеће факторе ризика када су у питању смртни исходи код кардиоваскуларних комбинација. Настанак хипертензије неријетко је повезан са промјеном у регулацији васкуларног тонууса. Поред хипертензије у чијој се терапији најчешће користе, вазодилатори такође имају значај и у терапији ангине пекторис, хипертензивних криза, периферних васкуларних обољења и прееклампсије. Спријечавање настанка и терапија гестацијске хипертензије показала се као веома битна код трудница, које су примљене у болницу са тешком прееклампсијом. Поред постојећих хипотензивних лијекова, који се користе код прееклампсије, постоји потреба за развојем нових терапијских могућности. Прехипертензија је такође изазовно стање, јер не захтјева увођење конвенционалне терапије, а многи пацијенти због не придржавања дијететско хигијенских мјера заврше са дијагнозом артеријске хипертензије. Због описаних стања постоји потреба за проналаском нових циљних мјеста за дејство вазодилатора, као и потреба да се изнова размотри употреба активних принципа биљног поријека. Биљке из породице <i>Labiatae</i> међу којима се налази и оригано примјењују се традиционално код особа обољелих од хипертензије. Екстракти биљака из рода <i>Origanum</i> показали су вазодилаторно дејство у <i>in vitro</i> студијама.</p> <p>Један од главних активних принципа у овим екстрактима који је задужен за испољавање њихових биолошких ефеката, јесте монотерпенско једињење карвакрол. Карвакрол [2-metil-5-(1-metil etil)-fenol] је једињење течног агрегатног стања које се у великом проценту налази у старским уљима биљака из породице <i>Labiatae</i>, нарочито у врстама <i>Thymus</i>,</p>		

Satureja, *Thymbra* и *Origanum*, које су саставни дио медитеранске исхране. Хемијски састав ових етарских уља, као и сам садржај карвакрола и сродних монотерпенских једињења у њему у великој мјери зависи од дроге биљке која се користи за екстракцију, као и од географског подручја и времена и начина сакупљања дрога. Кроз многобројне *in vivo* и *in vitro* студије описани су различити биолошки ефекти карвакрола, као што је његово антиинфламаторно, антиоксидативно, антитуморско, антибактеријско, антигљивично и нематодно дејство. Због мириса који подејећа на оригано и антимикробног дејства користи се као конзерванс у индустрији хране. Поред тога због свог антимикробног дејства, карвакрол се веома често налази у саставу ОТС препарата, који се користе у терапији уринарних инфекција, док се оригано може пронаћи као саставни дио чајних мјешавина за хипертензију. С обзиром на добро познете бенефите које медитеранска исхрана нуди када је у питању кардиоваскуларни систем, ови позитивни ефекти описани су и код изолованих активних принципа биљака које су саставни дио овакве исхране.

Карвакрол аплициран интраперитонеално успио је да снизи вриједности крвног притиска код анестезираних пацова, показујући на тај начин свој хипотензивни ефекат у *in vivo* систему. Такође је познато да је карвакрол снажан вазорелаксанс изолованих крвних судова пацова. Више различитих јонских канала и сигналних путева је укључено у механизам вазодилаторног дејства карвакрола, чинећи га веома комплексним. Активација K_v канала помоћу карвакрола довела је до релаксације претходно контрахованих аорти пацова. Такође се показало да је један од механизма вазорелаксантног дејства карвакрола и других монотерпенских једињења блокада L типа Са канала и спријечавање уласка јона калцијума у глатке мишићне ћелије. Многа монотерпенска једињења међу којима су еугенол, тимол и карвакрол, су доказани активатори TRP канала као што је TRPV3 (енг. *TRP vanilloid*). Повезаност између активације TRPV3 помоћу наведених монотерпенских молекула и настанка вазодилатације је већ описана на церебралним и утериним артеријама пацова. Треба истаћи да је карвакрол такође веома потентан активатор TRPA1 канала.

Комбинација антимафламаторног, антиоксидативног и вазодилаторног дејства чини карвакрол веома потенцијалном молекулом у терапији кардиоваскуларних обољења. TRPA1 канали су пронађени на периваскуларним неуронима у околини мезентеријума, те су по активацији отпуштали CGRP (енг. *Calcitonin Gene - Related Peptide*) и изазивали дилатацију околних крвних судова. Примјена HC-030031 (селективног блокатора TRPA1) у једној студији смањила је појачани менингеални проток крви изазван познатим агонистима TRPA1 канала, алил изотиоцијанатом и акролеином, указујући на значај овог канала у регулацији васкуларног тонуса менингеалних крвних судова. У церебралним артеријама TRPA1 канали су присутни на ендотелним ћелијама крвних судова, док њихово присуство на глатким мишићним ћелијама није било могуће потврдити, као ни на ендотелним ћелијама артерија у срцу, мезентеријуму, бубрегу и кожи. Активација TRPA1 у церебралним артеријама изазива ендотел-зависну вазодилатацију, која је изостала код ендотел TRPA1 нокаут мишева, као и у присуству блокатора HC-030031. Овакав одговор церебралних артерија на активацију TRPA1 остао је имун на блокаду NO синтетазе док је блокадом SK и IK Ca^{2+} -активираних калијумских канала дошло до потпуног изостанка вазодилатације. Ови налази указују да улазак јона калцијума кроз TRPA1 канале у ћелије ендотела доводи до даљег отпуштања калцијума из ендоплазматичног ретикулума, што за посљедицу има активацију SK и IK Ca^{2+} - активираних калијумских канала. Излазак јона калијума изазива хиперполаризацију ендотелних ћелија која се преноси на глатке мишићне ћелије и изазива релаксацију истих. Узимајући у обзир наведене резултате може се закључити да су TRPA1 потенцијално циљно мјесто за развој нових једињења са вазорелаксантним дејством.

Више различитих јонских канала и сигналних путева је укључено у механизам вазодилаторног дејства карвакрола, чинећи га веома комплексним. Активација K_v канала помоћу карвакрола довела је до релаксације претходно контрахованих аорти пацова. Такође се показало да је један од механизма вазорелаксантног дејства карвакрола и других монотерпенских једињења блокада L типа Ca канала и спријечавање уласка јона калцијума у глатке мишићне ћелије. Многа монотерпенска једињења међу којима су еугенол, тимол и карвакрол, су доказани активатори TRP канала као што је TRPV3 (енг. *TRP vanilloid*). Повезаност између активације TRPV3 помоћу наведених монотерпенских молекула и настанка вазодилатације је већ описана на церебралним и утериним артеријама пацова. Треба истаћи да је карвакрол такође веома потентан активатор TRPA1 канала. Комбинација антимиофламаторног, антиоксидативног и вазодилаторног дејства чини карвакрол веома потенцијалном молекулом у терапији кардиоваскуларних обољења. TRPA1 канали су пронађени на периваскуларним неуронима у околини мезентеријума, те су по активацији отпуштали CGRP (енг. *Calcitonin Gene - Related Peptide*) и изазивали дилатацију околних крвних судова. Примјена HC-030031 (селективног блокатора TRPA1) у једној студији смањила је појачани менингеални проток крви изазван познатим агонистима TRPA1 канала, алил изотиоцијанатом и акролеином, указујући на значај овог канала у регулацији васкуларног тонуса менингеалних крвних судова. У церебралним артеријама TRPA1 канали су присутни на ендотелним ћелијама крвних судова, док њихово присуство на глатким мишићним ћелијама није било могуће потврдити, као ни на ендотелним ћелијама артерија у срцу, мезентеријуму, бубрегу и кожи. Активација TRPA1 у церебралним артеријама изазива ендотел-зависну вазодилатацију, која је изостала код ендотел TRPA1 нокаут мишева, као и у присуству блокатора HC-030031. Овакав одговор церебралних артерија на активацију TRPA1 остао је имун на блокаду NO синтетазе док је блокадом SK и IK Ca^{2+} -активираних калијумских канала дошло до потпуног изостанка вазодилатације. Ови налази указују да улазак јона калцијума кроз TRPA1 канале у ћелије ендотела доводи до даљег отпуштања калцијума из ендоплазматичног ретикулума, што за посљедицу има активацију SK и IK Ca^{2+} - активираних калијумских канала. Излазак јона калијума изазива хиперполаризацију ендотелних ћелија која се преноси на глатке мишићне ћелије и изазива релаксацију истих. Узимајући у обзир наведене резултате може се закључити да су TRPA1 потенцијално циљно мјесто за развој нових једињења са вазорелаксантним дејством.

Да ли је предмет истраживања релевантан и у складу са предложеним насловом?

ДА

НЕ

5.4. Релевантност и савременост коришћених референци и литературе са списком литературе

- 1) Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2011; 30(1), 41–50.
- 2) Aydin Y, Kutlay O, Ari S, Duman S, Uzuner K, Aydin S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta medica*. 2007; 73(13), 1365–1371.
- 3) Bouyahya A, Chamkhi I, Benali T, Guaouguaou FE, Balahbib A, El Omari N, Taha D, Belmehdi O, Ghokhan Z, El Menyiy N. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *Journal of ethnopharmacology*. 2021; 265, 113318.
- 4) Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985; 313(5997), 54–56.

- 5) Chandrabalan A, McPhillie MJ, Morice AH, Boa AN, Sadofsky LR. N-Cinnamoylanthranilates as human TRPA1 modulators: Structure-activity relationships and channel binding sites. *European journal of medicinal chemistry*. 2019; 170, 141–156.
- 6) De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*. 2004; 75(7-8), 801–804.
- 7) Đukanović Đ, Gajić M, Škrbić R. Time-dependent and force-dependent vasoreactivity of isolated human umbilical arteries. *Scr. Med.* 2020; 51(3): 134–140.
- 8) Đukanović Đ, Bojić MG, Marinković S, Trailović S, Stojilković MP, Škrbić R. Vasorelaxant effect of monoterpene carvacrol on isolated human umbilical artery. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2022; 100(8), 755–762.
- 9) Earley S, Gonzales AL, Crnich R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. *Circulation research*. 2009; 104(8), 987–994.
- 10) Evaristo Rodrigues da Silva R, de Alencar Silva A, Pereira-de-Morais L, de Sousa Almeida N, Iriti M, Kerntopf MR, Menezes IRA, Coutinho HDM, Barbosa R. Relaxant Effect of Monoterpene (-)-Carveol on Isolated Human Umbilical Cord Arteries and the Involvement of Ion Channels. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020; 25(11), 2681.
- 11) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288(5789), 373–376.
- 12) Gagić Ž. In silico metode u otkriću novih molekula kao potencijalnih lijekova. Prvo izdanje. 2022. *Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci*.
- 13) Hariri L, Patel JB. Vasodilators. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554423/>
- 14) Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Journal of lipid research*. 2010; 51(1), 132–139.
- 15) Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation research*. 1987; 61(6), 866–879.
- 16) Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, Divya MG, Devaki T. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012; 360(1-2), 51–60.
- 17) Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta medica*. 2006; 72(14), 1330–1334.
- 18) Kunkler PE, Ballard CJ, Oxford GS, Hurley JH. TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain*. 2011; 152(1), 38–44.
- 19) Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. 2001; A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*. 2001; 91(3), 453–462.
- 20) Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. International Society of Hypertension (2001). Global burden of blood-pressure-related disease. *Lancet (London, England)*. 2008; 371(9623), 1513–1518.
- 21) Murphy TV, Kanagarajah A, Toemoe S, Bertrand PP, Grayson TH, Britton FC, Leader L, Senadheera S, Sandow SL. TRPV3 expression and vasodilator function in isolated uterine radial arteries from non-pregnant and pregnant rats. *Vascular pharmacology*. 2016; 83, 66–77.
- 22) Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MD, Lima FC, Lahlou S, Magalhães PJ,

- Ceccatto VM, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2010; 24(3), 341–350.
- 23) Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(18), 4331.
- 24) Santos CB, Lobato CC, Braga FS et al. Application of Hartree-Fock method for modeling of bioactive molecules using SAR and QSPR. *Comput Mol Biosci*. 2014.
- 25) Sarer E, Scheffer JJ, Baerheim Svendsen A. Monoterpenes in the essential oil of *Origanum majorana*. *Planta medica*. 1982; 46(4), 236–239.
- 26) Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M, Salehi B, Soltani-Nejad A, Rajabi S, Tajbakhsh M, Sharifi-Rad J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy research : PTR*. 2018; 32(9), 1675–1687.
- 27) Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)*. 2010; 376(9741), 631–644.
- 28) Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J Comput Chem*. 1989; 221–264.
- 29) Sullivan MN, Gonzales AL, Pires PW, Bruhl A, Leo MD, Li W, Oulidi A, Boop FA, Feng Y, Jaggar JH, Welsh DG, Earley S. Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Science signaling*. 2015; 8(358), ra2.
- 30) Tansey EM. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Comptes rendus biologiques*. 2006; 329(5-6), 419–425.
- 31) Testai L, Chericoni S, Martelli A, Flamini G, Breschi MC, Calderone V. Voltage-operated potassium (K_v) channels contribute to endothelium-dependent vasorelaxation of carvacrol on rat aorta. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2016; 68(9), 1177–1183.
- 32) Trailović SM, Marjanović DS, Nedeljković Trailović J, Robertson AP, Martin RJ. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitology research*. 2015; 114(8), 3059–3068.
- 33) Velankar S, Burley SK, Kurisu G, Hoch JC, Markley JL. The Protein Data Bank Archive. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2021; 2305, 3–21.
- 34) Verma J, Khedkar VM, Coutinho EC. 2010; 3D-QSAR in drug design--a review. *Current topics in medicinal chemistry*, 10(1), 95–115.
- 35) Wang J, Feng B, Yang X, Liu W, Xiong X. Chinese herbal medicine for the treatment of prehypertension. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013; 493521.
- 36) Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature neuroscience*. 2006; 9(5), 628–635.
- 37) Yankowitz J. Pharmacologic treatment of hypertensive disorders during pregnancy. *The Journal of perinatal & neonatal nursing*. 2004; 18(3), 230–240.

Да ли су коришћена литература и референце релевантне у погледу обима, садржаја и савремености.

ДА

НЕ

5.5. Циљеви истраживања

1. Испитати механизам вазодилаторног дејства карвакрола на изолованим хуманим умбиликалним артеријама:

- испитати улогу ендотела у вазодилатацији изазваној карвакролом;

- испитати улогу калијумских канала у вазодилатацији изазваној карвакролом;
 - испитати улогу калцијумских канала у вазодилатацији изазваној карвакролом;
 - испитати улогу TRP канала у вазодилатацији изазваној карвакролом;
2. Испитати улогу TRPA1 канала у вазодилатацији мезентеричних артерија изазваној карвакролом помоћу специфичног блокатора;
 3. Одређивање квантитативног односа између структуре и дејства агониста TRPA1, креирање и валидација QSAR (енг. *Quantitative Structure Activity Relationship*) модела;
 4. Компјутерско дизајнирање нових аналога карвакрола са унапријеђеном активношћу према TRPA1;
 5. Испитивање интеракције између карвакрола и његових дизајнираних аналога и TRPA1 протеина користећи молекулски докинг.

Да ли су циљеви истраживања јасно дефинисани и усклађени са предметом истраживања?

ДА

НЕ

5.6. Хипотеза истраживања: главна и помоћне хипотезе

Карвакрол активацијом TRPA1 рецептора доводи до вазодилатације изолованих хуманих крвних судова.
Новодизајниране молекуле имају побољшану активност у поређењу са карвакролом.

Да ли је хипотеза истраживања јасно дефинисана?

ДА

НЕ

5.7. Очекивани резултати

Резултати ове студије допринјели би бољем разумијевању вазодилаторног дејства изазваног карвакролом као и значају TRPA 1 канала у регулацији васкуларног тонууса. Захваљујући сазнањима проистеклим из ових истраживања TRPA 1 канали би могли постати ново циљно мјесто од интереса у лијечењу хипертензије.

Креирање валидираних *in silico* модела и дизајн нових молекула на бази структуре карвакрола, које имају побољшану активност, представља први и неизоставан корак у откривању нових једињења са потенцијалном примјеном у терапији повишеног крвног притиска.

Да ли је образложен научни значај и/или потенцијална примјена очекиваних резултата?

ДА

НЕ

5.8. План рада и временска динамика

Фаза 1

У првој фази одређиваће се механизам вазодилаторног дејства карвакрола на изолованим прстеновима ХУА. Испитаће се улога NO синтетазе, K_{ATP} , K_v и Ca^{2+} активираних калијумских канала, као и L типа Ca канала у механизму настанка вазодилатације изазване карвакролом помоћу кориштења одговарајућих инхибитора. Ова фаза трајаће 3 до 5 седмица.

Фаза 2

У другој фази испитаће се значај TRP канала у вазодилатацији изазваној карвакролом помоћу неспецифичног блокатора на ХУА, као и улога TRPA1 канала помоћу специфичног блокатора на ХМА. Временски период предвиђен за извођење ове фазе експеримента је 2 до 3 седмице.

Фаза 3

Статистичка обрада и приказ резултата *in vitro* истраживања кориштењем параметријских тестова (RM-two way ANOVA) помоћу SigmaPlot и GraphPad програма. Временски период за обраду ових података је једна седмица.

Фаза 4

Трећа фаза представља креирање QSAR модела у којем се прати повезаност између структуре и активности према TRPA1 каналима. Први корак у овој фази биће претрага хемијских база како би се формирао оптималан *data set*. Следећи корак представља креирање одговарајућег модела, а затим ће се вршити његова интерна и екстерна валидација. Ова фаза ће трајати 2 до 3 седмице.

Фаза 5

У овој фази вршиће се дизајн нових молекула на основу података добијених из QSAR модела. Нове молекуле треба да имају побољшану активност према TRPA1 каналима у односу на карвакрол. Време потребно за извођење ове фазе је око 3 седмице.

Фаза 6

У петој фази одрадиће се молекулски докинг, помоћу којег ће се рачунати енергија

везивања између лиганда и протеина, као и идентификација кључних аминокиселина које са лигандом остварују интеракцију неопходну за активност. Испитиваће се интеракција карвакрола као и новодизајнираних молекула са везни мјестом на TRPA1 каналу. Ова фаза ће трајати 2 до 3 седмице.

Да ли су предложени одговарајући план рада и временска динамика израде дисертације?

ДА

НЕ

5.9. Материјал и методологија рада

Методологија купатила за изоловане органе и ткива

Као извор препарата за спровођење испитивања механизма вазодилатације изазване карвакролом користиће се хумане умбиликалне артерије (ХУА) добијене из пупчаника и хумане мезентеричне артерије (ХМА) добијене из ткива након ресекције приликом абдоминалних операција. Ова ткива се сматрају медицинским отпадом и представљу широко распрострањен извор препарата за испитивање вазоактивних супстанци. ХУА се веома често користе у испитивању вазоактивних супстанци због своје доступности. Услед недостатка инервације, проток крви и васкуларни тонус ХУА је строго регулисан вазоактивним супстанцама, као што су серотонин, хомоцистеин, тромбоксан, брадикинин и простагладин F_{2α}, а што је веома погодно за испитивање механизма дејства спољних вазоактивних молекула. С друге стране ХМА осликавају системску циркулацију и омогућавају изучавање улоге ендотела и инервације у механизмима настанка вазоактивних промјена.

Након порођаја или хируршке интервенције на Универзитетском клиничком центру у Бањој Луци, узорци ће бити транспортован до Центра за биомедицинска истраживања, Медицинског факултета у Бањој Луци, поштујући процедуру транспорта хладним ланцем. Запримљени узорци могу се складиштити на температури од 4 °C и требају се искористити у току 48 сати. ХУА и ХМА треба очистити од околног везивног и масног ткива те исјећи у прстенове дужине 2-3 mm, а цијели поступак се спроводи у Петријевој посуди на леду како би се очувала виталност самих препарата. Двије нерђајуће кукице треба провући кроз лумен прстена ХУА или ХМА, а затим препарат уронити у комору испуњену Кребс-Рингер бикарбонатним раствором (37 °C и pH=7) који је аеризован смјешом 95% O₂ и 5% CO₂. Једна кукица ће бити повезана за трансдјусер који је прикачен за амплифајер са системом за снимање на рачунару, док ће друга кукица бити повезана за фиксну кукицу у комори, омогућавајући на тај начин подешавање пасивне тензије препарата. Прије почетка експерименталног протокола сваки препарат ће бити изложен оптималним експерименталним условима. Препарати ће се адаптирати 30 min у медијуму,

након чега ће се пасивна тензија подесити на 2 g и препарати ће се инкубирати 120 min. Током периода инкубације, 40 mmol/L KCl ће се додавати у три временске тачке (30, 60 и 120 min) како би покренули контрактилне механизме глатких мишићних ћелија, а између сваког додавања медијум у комори ће се промјенити 3 до 4 пута и пасивна тензија препарата ће се поново подесити на 2 g.

Крива доза-одговор за вазорелаксантни ефекат карвакрола ће бити одређена на ХУА и ХМА прекохрахованим са 1 $\mu\text{mol/L}$ фенилефрина.

Улога ендотелне NO синтетазе, као и различитих K канала биће испитана инкубацијом препарата 30 min са 0,1 mmol/L L-NAME (инхибитор NO синтетазе), 1 $\mu\text{mol/L}$ глибенкламида (блокатор K_{ATP} канала), 1 mmol/L 4-аминопиридина (блокатор K_v канала) или 1 mmol/L тетраетиламонијума (блокатор VK_{Ca} канала).

Функција L-типа Ca канала у вазодилатацији изазваној карвакролом испитаће се на два начина. Први начин ће се изводити у медијуму без јона калцијума, а карвакрол ће се инкубирати као блокатор L типа Ca канала у двије концентрације (0,3 или 1 mmol/L), док ће се као вазоконстриктор додавати BaCl_2 који у одсуству јона калцијума пролази кроз L типа Ca канала. Други начин укључује примјену специфичног активатора L типа Ca канала (BAY K8644), док ће се карвакрол такође инкубирати као блокатор у двије концентрације (0,3 или 1 mmol/L).

Одређивање улоге и значаја TRP канала испитаће се помћу изопентенил пирофосфата (неспецифични TRP блокатор) који ће се инкубирати у медијуму прије преконтракције ХУА са серотонином и релаксације карвакролом. С друге стране улога TRPA1 ће се испитати помоћу A-967079 (специфични блокатор TRPA 1) на изолованим ХМА.

Креирање и валидација QSAR модела

Први корак на почетку QSAR анализе представља одабир једињења чију структуру и активност желимо испитвати. У хемијској бази података ChEMBL потребно је пронаћи једињења сличне хемијске структуре која испољавају активност према TRPA1 и која представљају експериментални *data set*. Као улазни критеријум потребно је да је активност једињења одређена мјерењем инфлукса Ca^{2+} флуоресцентним тестом приликом активације хуманих TRPA1 испољених на HEK293 ћелијској линији. Активност је изражена као EC_{50} , а за потребе QSAR моделовања рачуна се декадни логоритам EC_{50} вредности, чиме се довијају pEC_{50} вриједности као зависне варијабле. Укупан број једињења се дијели насумичним одабиром на тренинг сет (минимално 20 једињења) и тест

сет (минимално 10 једињења). Тренинг сет се користи приликом креирања самог модела, док се тест сет користи за екстерну валидацију модела. За сва једињења одредиће се доминатни облици при физиолошкој рН вриједности помоћу програма MarvinSketch 15.9.21.0. 3D структура доминантних облика једињења ће се креирати у програму Chem3DUltra 7.0.0 док ће се енергетска минимизација креираних структура извршити помоћу Gaussian софтвера у склопу овог програма. Методе које ће се користити за минимизацију енергије су семиемпиријска PM3 метода, а послије ње прецизнија Hartree-Fock/3-21G метода.

Креирање QSAR модела биће одрађено у програму Pentacle, који користи GRIND дескрипторе (енг. *GRid - INdependent Descriptors*) добијене из молекулских поља интеракција. За прорачун молекулских поља интеракција користиће се 4 различите пробе: DRY проба (хидрофобне интеракције), O проба (акцептор водоничних веза), N1 проба (донор водоничних веза) и TIP проба (стерне интеракције). Следећи корак представља издвајање чворних региона (повољна интеракција између рецептора и лиганда) помоћу ALMOND алгоритма. GRIND дескриптори ће бити израчунати помоћу CLACC (енг. *Consistently Large Auto and Cross Correlation*) алгоритма, а вриједности ће бити представљене у облику корелограма гдје сваки пик представља једну варијаблу (интеракцију између два чворна региона). Селекција најкориснијих варијабли вршиће се употребом FFD (енг. *fractional factorial design*). Поступак ће се понављати све док се не добију најбоље вриједности параметара интерне валидације. PLS регресионом методом биће анализиран однос добијених варијабли и активности рЕС₅₀. Број латентних варијабли (ЛВ) ће бити подешен на 5 и биће одабран модел са оптималним бројем ЛВ.

Након креирања QSAR модела неопходно је извршити интерну и екстерну валидацију истог. Интерна валидација представља прорачуне који се врше само на молекулима из тренинг сета. Параметри интерне валидације су:

1. R^2 (коэффициент детерминације) - указује на квалитет фитовања модела. Његова вриједност треба бити што ближа 1,
2. Q^2 (валидациони регресиони фактор) - вриједност овог параметра треба бити > 0.5 , да би модел имао задовољавајућу предиктивну способност.

Екстерна валидација је неопходна да би се QSAR модел могао сматрати поузданим. У ту сврху се користи група једињења из тест сета. Параметри екстерне валидације су:

1. R^2_{pred} (предиктивни коэффициент корелације) – мјера способности модела да предвиди активност молекула из тест сета,

2. RMSEP (енг. *Root Mean Square Error of Prediction*) – средња квадратна грешка предвиђања показује грешку између стварних и предвиђених вриједности активности једињења из тест сета.
3. r^2_m (метрички параметри) – користе се када је неопходан ригорознији критеријум валидације. Вриједности параметара r^2_m и r^{c2}_m требају бити веће од 0,5, а вриједност Δr^2_m мања од 0,2 да би модел био прихватљив.

Молекулски докинг

Молекулски докинг је готово неизоставан дио *in silico* студија, јер испитивање интеракције између лиганда и протеина омогућава рационални приступ самом дизајну нових фармаколошки активних молекула. Прије почетка самог молекулског докинга неопходно је припремити лиганде и познавати 3D структуру протеина. Припрема лиганда представља провјеру јонизационог стања и стереоизомера лиганда, а такође је битно провјерити и формат у којем је сачувана структура лиганда (најчешће се користи Mol2 формат). У PDB (енг. *protein data bank*) бази могуће је пронаћи експериментално одређену 3D структуру TRPA1 протеина. Припрема протеина обухвата и додавање атома водоника који недостају у кристалографским структурама, као и уклањање молекула воде унутар мјеста везивања осим у случају када су молекули воде чврсто везани и доприносе укупном везивању лиганда за протеин. Такође је потребно дефинисати и очекивано мјесто везивања лиганда, прије почетка следеће фазе.

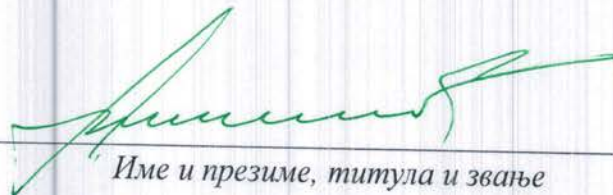
У другој фази врши се процјена и израчунавање афинитета везивања тј енергије комплекса лиганд-протеин. Лиганд се смјешта у мрешу која представља енергетску мапу условљену карактеристикама самог мјеста везивања на протеину, а затим алгоритам ствара велики број конформација лиганда истовремено рачунајући енергију везивања за сваку позу. Након вишеструког понављања, програм ће предложити најзначајнију позу, која има најмању енергију везивања. Такође могуће је идентификовати и кључне аминокиселине које остварују интеракцију са одређеним фармакофорама лиганда, а затим ове интеракције представити графички. Као и код остали *in silico* техника, неопходно је извршити валидацију докинг модела. Основни параметар валидације представља средњи квадрат девијације (енг. *root mean square deviation; RMSD*), а одређује се поређењем доковане са кокристализованом позом лиганда. Вриједност овог параметра треба да буде што је могуће ближа 0, а модел је задовољавајући у предвиђању позе ако је вриједност овог параметра мања од 2 Å. RMSD вриједност се израчунава поређењем доковане са кокристализованом позом лиганда.

Да ли су предвиђени материјал и методологија рада одговарајући?	<u>ДА</u>	НЕ
5.10. Мјесто, лабораторија и опрема за експериментални рад		
Мјесто и лабораторија: Центар за биомедицинска истраживања, Медицинског факултета, Универзитета у Бањој Луци.		
Опрема: 1. <i>in vitro</i> - купатило за изоловане органе, 2. <i>in silico</i> - Pentacle software, AutoDock software.		
Да ли су предвиђени одговарајуће мјесто, лабораторија и опрема за експериментални рад?	<u>ДА</u>	НЕ
Да ли је планирана сарадња са другим институцијама у земљи и иностранству?	ДА	<u>НЕ</u>
Да ли је тема подобна?	<u>ДА</u>	НЕ

6. ЗАКЉУЧАК		
Да ли студент испуњава прописане услове?	<u>ДА</u>	НЕ
Да ли је тема подобна?	<u>ДА</u>	НЕ
Да ли ментор испуњава прописане услове?	<u>ДА</u>	НЕ
Да ли коментор испуњава прописане услове?	<u>ДА</u>	НЕ
<p><i>Образложење (до 300 ријечи):</i></p> <p>На основу података о кандидату и разматрања образложења теме, комисија сматра да је кандидат Ђорђе Ђукановић својим досадашњим радом и постигнутим резултатима показао да је подобан кандидат за израду докторске дисертације.</p> <p>Предложена тема докторске дисертације „Значај TRPA1 канала као циљног мјеста вазодилаторног дејства карвакрола и примјена <i>in silico</i> метода у дизајну нових молекула са вазодилаторним дејством" је научно заснована, актуелна и са примјеном савремених, истраживачких метода, те представља оригинално научно истраживање у области медицинских и фармацеутских наука. Поред тога, научни допринос овог истраживања огледа се и у томе што ово истраживање представља почетну и неизоставну фазу у окривању и развијању нових лијекова, који ће свој ефекат испољавати на TRPA1 каналима, који су окарактерисани као ново циљно мјесто за дејство супстанци са вазодилаторним ефектом.</p> <p>Ментор др. Жарко Гагић, ванредни професор, запослен на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци, својим радом и постигнутим резултатима задовољава услов за менторство кандидата на III циклусу студија.</p>		

На основу изнијетих чињеница, комисија са задовољством даје **позитивну оцјену о подобности теме, кандидата и ментора** за израду докторске дисертације под називом „Значај TRPA1 канала као циљног мјеста вазодилаторног дејства карвакрола и примјена *in silico* метода у дизајну нових молекула са вазодилаторним дејством”.

Мјесто и датум: Бања Лука
28.3.2024. год.



Име и презиме, титула и звање

Проф. др Ранко Шкрбић, редовни професор, ужа
научна област фармакологија, Медицински
факултет, Универзитет у Бањој Луци

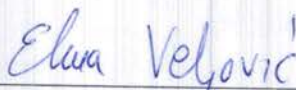
Предсједник комисије



Име и презиме, титула и звање

Проф. др Биљана Тубић, ванредни професор, ужа
научна област фармацеутска хемија, Медицински
факултет, Универзитет у Бањој Луци

Члан



Име и презиме, титула и звање

Проф. др Елма Вељовић, ванредни професор, ужа
научна област фармацеутска хемија,
Фармацеутски факултет, Универзитет у Сарајеву

Члан

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије дужан је да у извјештај унесе образложење, односно разлоге због којих не жели да потпише извјештај.