

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО:			
Орг. јед.	Број	Прилог	Вредност
05	6455/4-4		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број 01-3863/3-6 од 28.03.2017. године именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата *mg ph* Андриане М. Букоњић под називом:

„СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ
КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА β -АМИНОКИСЕЛИНАМА”

Чланови комисије су:

1. **проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;
2. **проф. др Тибор Ј. Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;
3. **доц. др Гордана П. Радић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан;
4. **доц. др Верица В. Јевтић**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;
5. **НС др Ивана Д. Радојевић**, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу:

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат *mg ph* Андриана М. Букоњић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Андриана М. Букоњић рођена је 16. 03. 1988. године у Краљеву. Основну школу и средњу Медицинску школу у Краљеву, смер - фармацеутски техничар, завршила је са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је 2007. године где је и дипломирала 2012. године са просечном оценом 9,59 (девет и 59/100). За време основних студија више пута је награђивана од стране факултета као један од најуспешнијих студената у генерацији (2008, 2010. и 2011.

године) и била стипендиста Министарства просвете, фондације Хемофарм и града Краљева. На завршној години основних студија била је стипендиста и Фонда за младе таленте Министарства омладине и спорта Републике Србије. Активно је учествовала на више конгреса и континуираних едукација.

Докторске академске студије (смер - Клиничка и експериментална фармакологија) уписала је школске 2012/13. године на Факултету медицинских наука. У периоду април 2013 - мај 2014, као стипендиста је ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом: „Предклиничка испитивања биоактивних супстанци” руководилац пројекта - доц. др Снежана Марковић (евиденциони број пројекта – ИИИ 41010). Положила је усмени докторски испит 21. јула 2014. године.

Од маја 2014. године засновала је радни однос као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска хемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, а од јуна 2016. године је ангажована у извођењу наставе у звању асистента.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама”

Предмет: Задатак овог истраживања је синтеза β -аминокиселине и одговарајућих комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама и испитивање њихове биолошке активности.

Хипотезе: Реакцијом β -аминокиселина и бакар(II)-нитрата наградиће се комплекси чији састав и структура ће бити потврђени на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије и рендгенске структурне анализе. Такође, комплекси бакра(II) са β -аминокиселинама показуће одређену биолошку активност.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је публикувао 7 радова у целости у часописима са рецензијом, од којих у једном раду М23 категорије први аутор, што указује да је остварен услов за пријаву докторске дисертације.

Вуконјић АМ, Томовић ДЛј, Никوليћ МВ, Мижаловић МŽ, Јевтић ВВ, Ратковић ЗР, Новакловић СБ, Богдановић ГА, Радојевић ИД, Максимовић ЈЗ, Васић СМ, Ћомић ЛјР, Трифуновић СР, Радић ГР. Antibacterial, antibiofilm and antioxidant screening of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-propyl derivative of thiosalicylic acid. Journal of Molecular Structure 2017; 1128: 330-7. **M23 IF=1,780**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Након веома добрих резултата које су показали комплекси платине у хемотерапији, велику пажњу привлаче комплекси бакра као потенцијални антитуморски агенси, али са још недовољно разјашњеним механизмом дејства.

Истраживања за сада показују да својства комплекса бакра углавном зависе од природе лиганата и донорских атома, али испитују се и разлике у активности комплекса бакар(I) и бакар(II). Установљено је да се координовање бакра са лигандима остварује преко донорских атома O, N, S и P. Значајну цитотоксичну активност показали су комплекси бакра(II)-јона који као лиганде садрже полидентатне Шифове базе, петочлане ароматичне хетероцикле (имидазол, пиразол, триазол) или шесточлане ароматичне хетероцикле (бипиридин-*bipy*), терцијарне фосфине.

Пажња новијих истраживања све више је усмерена ка синтези комплекса у којима су лиганди α -аминокиселине или њихови деривати. Студије се базирају на проучавању стабилности ових комплекса, њиховом везивању за ДНК и биолошкој активности. У комплексима у којима је лиганд био пептидни антибиотик (бацитрацин), а координовање вршено са двовалентним металима (манган, кобалт, никл, бакар и цинк) показано је везивање ових комплекса за ДНК молекула. Комплекс бакар(II) са бацитрацином показао је значајну оксидативну активност. Упоредна анализа три комплекса бакра(II) са глицином (*gly*), са аланином (*ala*) и са комбинацијом лиганата (*gly* и *bipy*) показала је да комплекс који поред аминокиселине има и хетероциклични лиганд показује најбољу интеракцију са ДНК и највећу цитотоксичну активност.

2.5. Значај и циљ истраживања

Бакар је један од биогених елемента због чега се његови комплекси сматрају мање токсичним и привлаче пажњу истраживача. Откриће потенцијалне антимицробне и антитуморске активности комплекса бакра(II) је битан предуслов за даља истраживања у области координовања бакра са лигандима од фармаколошког значаја.

Циљ истраживања је синтетисати β -аминокиселине и одговарајуће комплексе бакра(II) са β -аминокиселинама, као и извршити њихову карактеризацију и испитати потенцијалну антимицробну и антитуморску активност новосинтетисаних комплекса. Састав и структура добијених једињења биће потврђени на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонантне спектроскопије, магнетних мерења и рендгенске структурне анализе. У оквиру овог истраживања је предвиђено и да се испита интеракција новосинтетисаних комплекса са молекулом гуанозин-5'-монофосфата, праћењем супституционих реакција при физиолошким условима. Такође, пратиће се интеракција између синтетисаних комплекса и СТ-DNK (DNK изолована из крављег тимуса) и хумане DNK

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Претраживањем доступних публикованих резултата утврђено је да су истраживања усмерена ка синтези комплексних једињења са различитим лигандима или са различитим металним јонима са циљем да се синтетишу комплекси који би поред показане биолошке активности показали и селективност у погледу механизма дејства. Селективно дејство на

микроорганизме и туморске ћелије значајно би допринело мањем броју нежељених дејстава комплексних једињења као потенцијалних лекова. Обзиром да је бакар биогени елемент, а аминокиселине биогени макромолекули ови комплекси се сматрају мање токсичним. Прегледом до сада публикованих резултата утврђена је могућност синтезе комплекса бакра(II) са α -аминокиселинама, од којих су неки показали значајну биолошку активност. Међутим, студије у којима је испитивана активност комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама нису пронађене, што оставља могућност за будућа истраживања.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментално, *in vitro* истраживање. Испитивање ће бити вршено на материјалу животињског порекла, на материјалу хуманог порекла и на микроорганизмима.

Синтезе лиганата

Бидентатни лиганди β -амино-карбоксилних киселина биће добијени реакцијом циклохексанона, малонске киселине и амонијум-ацетата у молском односу 1:1:1. Како би се уклонио CO_2 , смеша циклохексанона (1 mol), малонске киселине (114,4 g) и амонијум-ацетата (177,1 g) у 600 mL бутанола ће се рефлуктовати у периоду од 1,5 h до 3 h. Испарљива једињења, чија је температура кључања до 135 °C, биће уклоњена дестилацијом. Реакциону смешу ћемо разблажити до 300 mL, а затим поновити дестилацију у вакууму под притиском од 10 до 20 mmHg до тачке кључања дестилата (128-130 °C). Вискозно уље се охлади до 20 °C и третира уз мешање са 700 mL ацетона, а затим остави да одстоји најмање 10 сати. Синтетисане аминокиселине ће се одвојити филтрирањем, испрати ацетоном и сушити на 100 °C.

Синтезе комплекса

Комплекси бакра(II) биће добијени директном реакцијом бакар(II)-нитрата трихидрата, β -аминокиселина и литијум-хидроксида у стехиометријском молском односу 1:2:2. Раствору добијеном растварањем бакар(II)-нитрата трихидрата у дестилованој води постепено ће се додавати одговарајућа β -аминокиселина. Реакциона смеша биће загревана на воденом купатилу уз мешање током 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаваће се раствор литијум-хидроксида. Добијени талог комплекса одвојићемо цеђењем, испрати дестилованом водом и сушити на ваздуху.

Елементална микроанализа

Елементална микроанализа биће извршена на Хемијском факултету Универзитета у Београду на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer у CHS моду.

Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра биће спроведено помоћу спектрофотометра Perkin-Elmer FTIR 31725X применом технике KBr пилуле на Природно-математичком факултету у Крагујевцу.

Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонантних спектра (^1H NMR и ^{13}C NMR) лиганата биће спроведено на Природно-математичком факултету у Крагујевцу.

Магнетна мерења

Магнетна мерења синтетисаних комплекса вршиће се на температури од 294 К Евансовом методом коришћењем апарата MSB (Magnetic Susceptibility Balance) - MK1 (Scherwood Scientific Ltd., Cambridge England) са $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ као калибрантом. Дијамагнетичне корекције биће израчунате на основу Паскалових константи.

Рендгенска структурна анализа

Кристали погодни за рендгенску структурну анализу биће добијени спором прекристализацијом из система диметилсулфоксид (DMSO)-вода. Прекристализација ће се извршити у лабораторији за Фармацију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Рендгенска структурна анализа кристала биће извршена анализом X-зрака на Институту за хемију, Универзитета Р. Ј. Šafárik у Кошицама, Словачка.

Кинетичка мерења

Кинетика и механизам супституционих реакција комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама биће утврђени помоћу *Stopped-flow* спектрофотометра у 25 mM *Hepes* пуферу, $\text{pH} \approx 7,2$. Све реакције биће проучаване као реакције *pseudo*-првог реда. Спектрофотометријско одређивање константе брзине *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , врши се праћењем промене апсорпције раствора A_t са временом t на одређеној таласној дужини. Компјутерским програмом *Microsoft Excell 2007* и *OriginPro 8* одредиће се вредности константи.

Интеракције комплекса са ДНК

Апсорпциона спектроскопска мерења

Апсорпциона мерења биће вршена у фосфатном пуферу (0,01 M, $\text{pH} = 7,4$). Серија раствора комплекс-ДНК се припрема мешањем раствора комплекса константне концентрације (8 μM) са инкрементима ДНК полазног раствора (1,25 mM). Интеракције

комплекса са ДНК одредиће се на основу вредности константе везивања (K_b) добијене помоћу UV-VIS спектрофотометрије.

Флуоресцентна мерења

Интеракције комплекса са ДНК испитиваће се и на основу флуоресцентне спектроскопије. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације 527 nm, а флуоресцентне емисије на 612 nm. Да би се установило да ли синтетисани комплекси могу да замене ЕБ (етиридијум-бромид) из његовог ДНК-ЕБ комплекса проучићемо интеракције комплекса са ДНК у присуству ЕБ. Могући ефекти везивања комплекса за ДНК проучиће се снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса (0-80 μ M) у раствор ДНК-ЕБ.

***In vitro* антимикуробна активност**

Антимикуробна активност синтетисаних комплекса обухватиће испитивања на бактеријама, квасцима и гљивицама. Сва испитивања из ове области биће спроведена у Лабораторији за микробиологију на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Антимикуробна активност биће одређена на основу вредности минималних инхибиторних концентрација и минималних микробицидалних концентрација испитиваних микродилуционом методом. Као позитивне контроле биће коришћени тетрациклин и амфотерицин Б, а како би се искључио ефекат растварача (диметилсулфоксида) на раст микроорганизама пратиће се и његов утицај у концентрацији од 10%.

***In vitro* антитуморска активност**

Антитуморска активност добијених једињења биће урађена у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Потенцијална антитуморска активност комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама као лигандима испитиваће се *in vitro* на туморским ћелијама. Ћелије које ће бити коришћене су ћелије карцинома колона (HCT-116 (ATCC[®] CCL-247[™]), SW480 (ATCC[®] CCL-228[™]) и CaCo-2 (ATCC[®] HTB-37[™])). Ефекти тестираних једињења на ћелијску вијабилност биће одређени МТТ (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue) тестом колориметријског техником.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

На основу досадашњих истраживања која су утврдила да комплекси бакар(II) и α -аминокиселина, односно њихових деривата везују за ДНК, очекује се и интеракција комплекса бакар(II) са β -аминокиселинама и генетским материјалом. Новосинтетисани комплекси бакра(II) са β -аминокиселинама би требало да покажу одређену биолошку активност. Постојање биолошке активности омогућило би даља (*in vivo*) истраживања ових комплекса у циљу проналаска потенцијалних фармакотерапеутика и такође усмерило

испитивања синтезе комплекса различитих β -аминокиселинама са багром или другим металима.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Истраживања за сада показују да својства комплекса бакра углавном зависе од природе лиганда и донорских атома. Утврђено је да комплекси бакра(II) са α -аминокиселинама показују значајну биолошку активност, али студије у којима је испитивана активност комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама нису пронађене. Дисертација је усмерена ка синтеза и карактеризација наведених комплекса и испитивање њихове биолошке активности. Након синтезе комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама установићемо њихов састав и структуру на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, магнетних мерења и рендгенске структурне анализе. Истраживањем је планирано да се утврди механизам и кинетика супституционих реакција синтетисаних бакар(II) комплекса, испита њихова интеракција са ДНК и покаже потенцијална антимикуробна и антитуморска активност. Сва истраживања ће бити спроведена у за то референтним установама и уз поштовање одговарајућих протокола. Постојање биолошке активности омогућило би даља (*in vivo*) истраживања ових комплекса у циљу проналаска потенцијалних фармакотерапеутика и такође усмерило испитивања синтезе комплекса β -аминокиселина са багром или другим металима.

3. Предлог ментора

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже **доц. др Јовану Богојевски**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија.

Доц. др Јована Богојевски поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

1. Milutinović MM, **Bogojeski JV**, Klisurić O, Scheurer A, Elmroth SK, Bugarčić ŽD. Synthesis and structures of a pincer-type rhodium(III) complex: reactivity toward biomolecules. Dalton Trans. 2016; 45(39): 15481-91.
2. **Bogojeski J**, Volbeda J, Bugarčić ŽD, Freytag M, Tamm M. Platinum(II) complexes with hybrid amine-imidazolin-2-imine ligands and their reactivity toward bio-molecules New Journal of Chemistry, 2016; 40: 4818-25.
3. **Bogojeski J**, Volbeda J, Freytag M, Tamm M, Bugarčić ŽD. Palladium(II) complexes with highly basic imidazolin-2-imines and their reactivity toward small bio-molecules. Dalton Trans. 2015; 44(39): 17346-59.

4. Bugarčić ŽD, **Bogojeski J**, Eldik R. Kinetics, mechanism and equilibrium studies on the substitution reactions of Pd(II) in reference to Pt(II) complexes with bio-molecules Coordination Chemistry Review, 2015; 292: 91-106.
5. Bugarčić ŽD, **Bogojeski J**, Petrović B, Hochreuther S, van Eldik R. Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. Dalton Trans. 2012; 41(40): 12329-45.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална фармакологија.

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;
2. **проф. др Тибор Ј. Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;
3. **доц. др Гордана П. Радић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан;
4. **доц. др Верица В. Јевтић**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;
5. **НС др Ивана Д. Радојевић**, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биологија, члан.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове *mr ph* Андриане М. Букоњић комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради *докторске дисертације*.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да прикаже синтезу и карактеризацију нових комплексних једињења бакра(II) са β -аминокиселинама и покаже њихову потенцијалну биолошку активност.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза *mr ph* Андриане М. Букоњић бити од великог научног, практичног и потенцијално клиничког значаја.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме *докторске дисертације* кандидата *mr ph* Андриану М. Букоњић под називом „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са β -аминокиселинама” и одобри њену израду.

проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија и
Онкологија, председник

проф. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у
Београду, за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан;

доц. др Гордана П. Радић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан;

доц. др Верица В. Јевтић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у
Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;

НС др. Ивана Д. Радојевић, научни сарадник Природно-математичког факултета
Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биологија, члан.

У Крагујевцу, 25. 04. 2017.