

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-1044/43 од 02.11.2016. год., именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата дипл. фарм. Душана Вукићевића под називом: „Секундарни метаболити биљних врста *Cephalaria ambrosioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult (Caprifoliaceae) и *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh (Asteraceae) и нова биолошка активна синтетска  $\beta$ -гиакарбонилна једињења“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у же научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармација, председник.
2. **Проф. др Ратомир Јелић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан.
3. **Проф. др Полина Благојевић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Органска хемија и биохемија, члан.

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

**2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

Кандидат дипл. фарм. Душан вукићевић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета Медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

**2.1. Кратка биографија кандидата**

Дипл. фарм. Душан Вукићевић је рођен 18.04.1977. године у Приштини. Основну школу

и Прву крагујевачку гимназију завршио је у Крагујевцу. Студије фармације уписао је 1996/97. године на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду, а дипломирао 2010. године са просечном оценом 7,58 (седам и 58/100) и оценом 10 (десет) на дипломском испиту, чиме је стекао звање магистар фармације. Након завршених студија, у Апотекарској установи Београд обавио је обавезан приправнички стаж и положио стручни испит за магистра фармације. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија, уписао је школске 2013/14. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу и положио све планом и програмом предвиђене испите. Усмени докторски испит положио је са оценом девет, 21.07.2016. године. Радио је у апотекама ЗУА „Lilly Drogerie a.d.“, ЗУА „Нана“, Крагујевац и ЗУ „Вену“ (Јагодина и Рача).

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** „Секундарни метаболити биљних врста *Cephalaria ambrosioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult (Caprifoliaceae) и *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh (Asteraceae) и нова биолошки активна синтетска  $\beta$ -тиакарбонилна једињења“.

**Предмет:** Одређивање хемијског састава етарских уља биљних врста *Cephalaria ambrosioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult (Caprifoliaceae) и *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh (Asteraceae) (познатих по етнофармаколошкој употреби), изоловање неких метаболита и испитивање њихове биолошке активности, као и синтеза, спектрална карактеризација, токсичност и биолошка активност четири серије од по једанаест  $\beta$ -тиакарбонилних једињења (три серије  $\beta$ -кетосулфида и једна  $\beta$ -карбометоксисулфида).

**Хипотезе:** Одређивање састава етарског уља врсте *C. ambrosioides* и његово поређење са литературним подацима, пружиће увид у потенцијалну фармаколошку вредност и (хемо)таксономску припадност дате биљне врсте. Етарско уље *P. dysenterica*, због претпостављеног антидизентеријског дејства, добар је кандидат за скрининг потенцијалних антимикробних супстанци.  $\beta$ -Тиакарбонилна једињења ( $\beta$ -кетосулфида и  $\beta$ -карбометоксисулфида), која настају тиа-Мајкловом адицијом тиофенола на одговарајућа коњугована карбонилна једињења, би требало да поседују антимикробну активност.

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио два научна рада у целини, три саопштења на међународним и једно на домаћем научном скупу. Први је аутор једног од објављених радова (у часопису **категорије M22**), чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

**D. R. Vukićević, D. D. Stevanović, M. S. Genčić, P. D. Blagojević, N. S. Radulović**, Essential-oil constituents and alkanes of *Cephalaria ambrosioides* Roem. & Schult. (family Caprifoliaceae, subfamily Dipsacaceae). (Chemo)taxonomic discernment of the subfamilies *Dipsacaceae* and *Morinaceae*, *Chem. Biodiv.* **2016**;13:198–209).

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Многобројне биљне врсте се у традиционалној медицини вековима користе за лечење различитих болести, али у великом броју случајева није (у потпуности) познато који њихови састојци (најчешће секундарни биљни метаболити) су носиоци жељене биолошке активности. Таква ситуација је и са биљкама родова *Cephalaria* и *Pulicaria*, па ће у овој студији бити изучавани метаболити биљних врста *Cephalaria ambrosioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult (Caprifoliaceae) и *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh (Asteraceae).

Биљне врсте рода *Cephalaria* се већ дуго користе у народној медицини, а истраживања су показала да њихови састојци поседују широк спектар биолошке активности. Састав етарског уља врсте *C. ambrosioides*, једног од представника овог рода, није проучен, а у литератури је описана само студија о изоловању тритерпенских сапонина из надземних делова овог таксона. С друге стране, *P. dysenterica*, вишегодишња биљна врста јужне, западне и централне Европе, познат је народни лек против дизентерије, која је у средњем веку употребљавана и као репелент. Антидизентеријско дејство указује на потенцијални антимикуробни ефекат етарског уља ове врсте, али детаљна испитивања у том погледу нису обављена. Често се из биолошки активних етарских уља могу изоловати поједини састојци – носиоци дате активности. Ови састојци, поготову онда када је одговарајућим биолошким тестовима утврђен механизам њиховог деловања, могу послужити као модел за синтезу нових једињења, било парцијалном модификацијом, било потпуно новом синтезом. На овај начин се добијају деривати сличне структуре, са сличном биолошком активношћу и сличном потенцијалном фармаколошком употребом. У литератури нема података везаних за

овакав тип испитивања који се тичу биљне врсте *P. dysenterica* (постоје само извесни подаци о саставу њеног етарског уља).

Иако је најстарија (и најчешће најјефтинија) „апотека“ - природа - била и остала веома важан извор антибиотика, синтеза и тестирање антимикуробне активности нових једињења је најизгледнији пут за откривање нових фармаколошки занимљивих препарата . Неколико новијих студија показало је да  $\beta$ -тиакарбонилна једињења различите структуре ( $\beta$ -кетосулфиди и  $\beta$ -карбометоксисулфиди)показују значајну антимикуробну активност.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

### *Значај студије*

Значај ове студије огледа се у неколико аспеката. Прво, резултати добијени током истраживања свакако ће допринети расветљавању хемијског састава етарског уља биљке *Cephalaria ambrosioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult (Caprifoliaceae) (праскоч). Друго, утврђивање састава и биолошке активности етарског уља биљне врсте *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh (Asteraceae) (срчун) могло би да расветли њену примену у народној медицини и укаже на даљу потенцијалну фармаколошку употребу. Најављено изоловање и хемијска модификација (и/или комплетна синтеза) појединих састојака могла би да утре пут ка открићу тзв. „водећих једињења“ (енгл. lead compounds) у синтези нових фармаколошких препарата. Треће, детаљан хемијски састав узорака етарских уља изолованих из одговарајућих биљних врста, може се искористи у хемотаксономске сврхе, за разрешавање одређених недоумица које се тичу таксономије разматраних таксона. И коначно, синтеза серије  $\beta$ -кетосулфида и  $\beta$ -карбометоксисулфида (од којих ће највећи део бити синтетисан по први пут), и утврђивање њихове биолошке активности, може дати резултате врло занимљиве са тачке гледишта медицинске хемије и фармакологије.

### *Циљеви студије*

Основни циљеви ове студије су следећи:

- Добијање (хидродестилацијом) етарског уља биљне врсте *C. ambrosioides* и утврђивање његовог тачног хемијског састава;

- Поређење састава етарског уља ове биљне врсте са саставом етарских уља одабраних представника исте биљне фамилије (литературни подаци) мултиваријантном статистичком анализом, што би омогућило додатни увид у њихове таксономске односе.
- Добијање (хидродестилацијом) и утврђивање хемијског састава и биолошке активности етарског уља биљке *P. dysenterica*;
- Изоловање (бар) најзаступљеније компоненте етарског уља ове биљке, његова хемијска модификација (и/или комплетна синтеза) и испитивање биолошке активности тако добијених деривата;
- Синтеза (адицијом одговарајућих тиофенола на конјуговане кетоне у присуству цирконијумских катализатора) и спектроскопска карактеризација три серије  $\beta$ -кетосулфида и једне  $\beta$ -карбометоксисулфида;
- Испитивање токсичности (у моделу рачића *Artemia salina*) и антимицробне активности синтетисаних  $\beta$ -тиакарбонилних једињења.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

До сада је изучен хемијски састав етарског уља неколико биљних врста рода *Cephalaria* (о чему у литератури постоје одговарајући подаци), али не и врсте *C. ambrosioides*. У том смислу, детаљна анализа састава етарског уља врсте *C. ambrosioides* представљаће значајан допринос у овој области. Поред осталог, она ће омогућити нова сазнања о таксономији овог рода на основу мултиваријационе статистичке анализе добијених резултата и литературних података.

Састав етарског уља биљне врсте *P. dysenterica* већ је био предмет изучавања неких студија описаних у литератури. Међутим, није описан покушај изоловања појединих компонената из тог уља, као ни њихова хемијска модификација, иако је такав приступ испитивању природних производа врло користан и прилично устаљен. Он, наиме, омогућава „синергију“ фитохемије (изоловање, утврђивање хемијске структуре и биолошке активности природних производа – секундарних биљних метаболита) и медицинске хемије (хемијска модификација природних производа, синтеза деривата и аналога са фино подешеном/побољшаном биолошком активношћу).

У литератури су описана бројна  $\beta$ -тиакарбонилна једињења (нарочито  $\beta$ -кетосулфиди), а нека од њих показују извесну биолошку активност. Синтеза предвиђена овом студијом

(тиа-Мајклова адиција) омогућава добијање великог броја тих једињења, која се међусобно разликују по супституенту везаном за карбонилну групу, за сумпор или по оба. Таквим варирањем структуре ових једињења могуће је добити дериват чија је биолошка активност занимљива.

## 2.7. Методе истраживања

### *Врста студије*

Експериментална студија која обухвата (i) добијање етарских уља (хидродестилацијом) две врсте биљака – *C. ambrosioides* и *P. dysenterica*, (ii) анализу тих уља хамијским и инструменталним методама, (iii) синтезу већег броја  $\beta$ -тиакарбонилних једињења, (iv) њихову спектралну карактеризацију и (v) *in vitro* антимикуробни скрининг.

### *Добијање етарских уља*

Биљни материјал ће бити сакупљен на Сувој планини и у околини Ниша (са обала Нишаве). Надземни делови биљке у цвету ће, по сушењу на собној температури до константне масе и ситњења, бити подвргнути хидродестилацији у одговарајућем апарату (*Clevenger*), у току 2,5 сата за добијање етарских уља (у лабораторијама Природно-математичког факултета у Крагујевцу и Природно-математичког факултета у Нишу).

### *Гасна хроматографија са масеном детекцијом*

Биће вршена гасна хроматографија са масеном детекцијом (GC-MS) на апарату Hewlett-Packard 6890N, на капиларној колони 30 m  $\times$  0,25 mm, са стационарном фазом HP-5MS (5 % фенил-метилсилоксан) (у лабораторијама Природно-математичког факултета у Нишу). Изоловање, раздвајање и пречишћавање, биће вршено колонском хроматографијом, „dry-flash“ хроматографијом и течном хроматографијом под средњим притисцима (MPLC).

### *Синтеза $\beta$ -тиакарбонилних једињења*

Синтеза  $\beta$ -тиакарбонилних једињења -  $\beta$ -кетосулфида опште формуле  $R-COCH_2CHR^1-S-Ar$ , где је  $R=H$ , а  $R^1 = CH_3$  или  $C_2H_5$  и  $R, R^1 = -(CH_2)_3-$ , а  $Ar = C_6H_5-(o, m, p)$  ( $R^2$  ( $R^2$  алкил-група, флуор и хлор) и  $\beta$ -карбометоксисулфида опште формуле  $CH_3OOCCH_2CH_2-S-Ar$ , где је  $Ar = C_6H_5-(o, m, p)R^2$  ( $R^2$  алкил-група, флуор и хлор) – биће остварена (у

лабораторијама Природно-математичког факултета у Крагујевцу и Природно-математичког факултета у Нишу) применом недавно описане варијанте тиа-Мајклове адиције (катализоване једињењима цирконијума) одговарајућих тиофенола ((*o*, *m*, *p*)- $R^2-C_6H_5-SH$ ,  $R^2$  алкил-група, флуор и хлор) на одговарајуће еноне (бут-3-ен-2-он, пент-1-ен-3-он и циклохекс-2-енон), односно на метил-акрилат.

### *Спектрална анализа*

У циљу спектралне и структурне карактеризације добијених и изолованих једињења примениће се нуклеарна магнетна спектроскопија ( $^1H$ - и  $^{13}C$ -NMR, једно- и дводимензионална), инфрацрвена спектроскопија (IR), ултраљубичаста-видљива спектроскопија (UV-Vis) и масена спектрометрија (MS) (у лабораторијама Природно-математичког факултета у Нишу).

### *In vitro* антимикуробни тестови и токсичност

Антимикуробна активност биће одређена микродилуционом методом у бујону, тестови токсичности у моделу рачића *Artemia salina* (у лабораторијама Природно-математичког факултета у Нишу). Студије ове врсте не захтевају одобрење локалних етичких одбора

### *Статистичка обрада података*

За статистичку обраду добијених података и утврђивање значајности разлике између средњих вредности биће примењена једнострана анализа варијанце (ANOVA), са интервалом поверења 95%. Метода анализе главне компоненте (PCA) и агломеративна хијерархијска кластер анализа (АНС) добијених сетова података вршиће се помоћу Excel plug-in програма XLSTAT, 2014.4. Обе методе ће бити примењене на следећим сетовима варијабли: оригиналне варијабле (процентуални садржај састојака који је већи од 1%) и суме процената класа једињења (монотерпени (М), сесквитерпени (С), дитерпени (Д), једињења изведена из шикиматног биосинтетског пута (СМ), једињења изведена из метаболизма масних киселина (ММК) и остало (О) – као шеста класа). У случају АНС анализе примениће се: Пирсонова (Pearson) разлика (као критеријум груписања користиће се су просто повезивање, просечна веза између група *unweighted-pair-group average* и потпуно повезивање) и Еуклидска удаљеност (критеријум груписања: просечна

веза између група- *unweighted pair-group average* и Вардов (Ward) метод). Вршеће се РСА анализа Пирсоновог (н) типа.

## 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Од ове студије очекују се следећи резултати:

- Утврђивање хемијског састава етарског уља биљке *C. ambrosioides* (Caprifoliaceae) и разрешење неких таксономских питања у оквиру биљног рода/породице коме припада;
- Утврђивање састава и биолошке активности биљне врсте *P. dysenterica* (Asteraceae);
- Изоловање неких састојака из овог уља у чистом стању, њихова хемијска трансформација и/или комплетна синтеза и скрининг биолошке активности;
- Синтеза серије  $\beta$ -тиакарбонилних једињења ( $\beta$ -кетосулфида и  $\beta$ -карбометоксисулфида), спектроскопска карактеризација, токсичност и скрининг антимикробне активности ових једињења.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Од почетка индустријске производње пеницилина, средином 20. века, антибиотици играју веома важну улогу у здравственој заштити, спасавајући милионе живота. Нажалост, ефикасност антибиотика видно је опала због тога што су неке бактерије развиле високу резистенцију на њих. Ово снажно мотивише научну заједницу, пре свега медицинаре и медицинске хемичаре, да тражи нове антибактеријске супстанце које бактерије неће „препознати“. У овој студији ће као могући извор потенцијалних антимикробних агенаса бити разматрани метаболити биљних врста *C. ambrosioides* (Caprifoliaceae) и *P. dysenterica* (Asteraceae), као и серија нових синтетских  $\beta$ -тиакарбонилних једињења ( $\beta$ -кетосулфиди и  $\beta$ -карбометоксисулфиди). У том циљу биће изолована етарска уља/секундарни метаболити ових биљних врста, а њихов састав/структура анализирани хемијским и инструменталним методама. Мултиваријационо статистичко поређење састава етарских уља врсте *C. ambrosioides* и других одабраних таксона одговарајуће биљне породице (Caprifoliaceae; подаци доступни у литератури) бациће нову светлост на извесна таксономска питања везана за род *Cephalaria* и његов положај у оквиру биљне породице којој ова врста припада. У



потрази за једињењима израженије биолошке активности, из етарског уља *P. dysenterica* биће изоловане и хемијски модификовани (и/или комплетно синтетисани) неки састојци. Коначно, тиа-Мајкловом адицијом 11 тиофенола на четири конјугована карбонилна једињења (у присуству цирконијумских катализатора) добиће се више од четрдесет  $\beta$ -тиакарбонилних једињења, од којих ће највећи део бити окарактерисан по први пут. Скрининг њихове токсичности и антимикробне активности биће, такође, обухваћени.

### 3. Предлог ментора

Комисија предлаже за ментора ове докторске дисертације **проф. др Ника Радуловића**, редовног професора Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Органска хемија и биохемија. Предложени наставник 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

##### Радови у вези са темом докторске дисертације

1. Radulovic N S, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 2013; 20(7):932-952.
2. Radulovic N S, Blagojevic PD. Average mass scan of the total ion chromatograms: A new gas chromatography-mass spectrometry derived variable for fast and reliable multivariate statistical treatment of essential oil compositional data. *J Chromatogr A* 2013; 1301:190-199.
3. Radulovic N S, Ziatkovic, DB, Ilic-Tomic T, Senerovic L, Nikodinovic-Runic J. Cytotoxic effect of *Reseda lutea*: A case of forgotten remedy. *J Ethnopharmacol* 2014; 153(1):125-132.
4. Radulovic NS, Mladenovic MZ, Randjelovic PJ, Stojanovic NM, Dekic M S, Blagojevic PD. Toxic essential oils. Part IV: The essential oil of *Achillea lalcata* L. as a source of biologically/pharmacologically active trans-sabinyol esters. *Food Chem Toxicol* 2015; 80:114-129.
5. Radulović N, Blagojević P, Randjelović P, Stojanović, N. The last decade of antinociceptive alkaloids: Structure, synthesis, mechanism of action and prospect. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2013; 13(17):2134-2170.
6. Radulović N, Miltojević A, Stojković M, Blagojević P. New volatile sulfur-containing

compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L., Liliaceae). *Food Research International*, 2015; 78:1-10.

7. Ilić D, Damljanović I, Stevanović D Vukićević M, Radulović NS, Kahlenberg V, Laus G, Vukićević RD. Synthesis, spectral characterization, electrochemical properties and antimicrobial screening of sulfur containing acylferrocenes. *Polyhedron* 2010; 29(7): 1863-1869.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина, Клиничка и експериментална фармакологија.

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармација, председник.
2. **Проф. др Ратомир Јелић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан.
3. **Проф. др Полина Благојевић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Органска хемија и биохемија, члан.

#### **Закључак и предлог комисије**

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове дипл. фарм. Душана Вукићевића, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради *докторске дисертације*.
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, а методологија прецизна и јасна.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска дисертација бити од научног и практичног значаја, јер ће добијеним резултатима расветлити хемијски састав етарских уља две биљне врсте са подручја Србије. Такође ће бити значајно најављено изоловање, хемијска модификација и скрининг биолошке активности неких састојака у чистом стању, као и синтеза, карактеризација и скрининг биолошке активности

више од 40 (углавном нових)  $\beta$ -тиакарбонилних једињења.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата дипл. фарм. Душана Вукићевића под називом „Секундарни метаболити биљних врста *Cephalaria ambrosioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult (Caprifoliaceae) и *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh (Asteraceae) и нова биолошки активна синтетска  $\beta$ -тиакарбонилна једињења“ и одобри њену израду.

#### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

1. **Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармација, председник;

---

2. Проф. др Ратомир Јелић, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија;

---

3. Проф. др Полина Благојевић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Органска хемија и биохемија, члан;

---

**У Крагујевцу, 27.11.2016. године**