

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-989/32 од 12.12.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Ане Станковић** под називом:

„Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са S,O-тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области *Микробиологија и имунологија; Онкологија*, председник;
2. **Доц. др Јелена Пољаревић**, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;
3. **Проф. др Верица В. Јевтић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;
4. **Доц. др Јована В. Богојески**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;
5. **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 следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Ана Станковић** 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

Маг. фарм. Ана Станковић је рођена 22.08.1992. године у Приштини. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу. Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је 2011. године и дипломирала 2016. године са просечном оценом 9,42 (девет и 42/100). Школске 2016/17. године уписала је докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Истраживања у фармацији. Усмени докторски испит је положила 2018. године са оценом 9. Стручни испит за магистра фармације положила је пред комисијом Министарства здравља 2017. године. Учествовала је на XXVI конференцији Српског кристалографског друштва, XV конференцији Удружења психијатара Србије, као и 56. Конгресу студената биомедицинских наука са интернационалним учешћем.

Од 2018. године је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у звању истраживач – приправник, на пројекту ОИ172016 под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине неорганских једињења и одговарајућих комплекса метала” Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине”

Предмет: Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности, као и интеракција лиганда и комплекса бакра(II) са дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК

Хипотезе: Реакцијом S,O-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине и бакар(II)-нитрата трихидрата наградиће се моноклеарни, квадратно-планарни комплекси који ће бити окарактерисани на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, електронске-парамагнетне-резонанције и рендгенске структурне анализе. Даљим биолошким испитивањима, очекује се да ће синтетисани комплекси показати одговарајућу антимикробну и антитуморску активност.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Ана Станковић, је објавила рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Stanković AS**, Kasalović MP, Bukonjić AM, Mijajlović MŽ, Tomović DLj, Nikolić MV. Biological activity of Au(III) complexes. Ser J Exp Clin Res. 2019. doi: 10.2478/sjecr-2019-0050. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Бакар је есенцијални микроелемент неопходан за правилан раст, интегритет кардиоваскуларног система и неоваскуларизацију, метаболизам гвожђа, функцију неуроендокриног система, итд. Бакар улази у састав ензима цитохром *c* оксидазе, лизил оксидазе, допамин монооксигеназе и церулоплазмина. Као акцептор електрона, бакар учествује у процесима оксидо-редукције и уклањању слободних радикала чиме штити протеине, нуклеинске киселине и липиде ћелијских мембрана од оштећења. Менкесова болест (John Hans Menkes) је ретко херeditарно обољење углавном мушке дече чији је узрок мутација гена смештеног на X хромозому (*ATP7A* или Менкесов ген) који кодира протеин транспортер бакра-*ATP7A* што ствара дефицијенцију овог метала у организму која је праћена многим аномалијама па и неуролошким поремећајима. Супротно, накопљање бакра у организму је карактеристика Вилсонове болести (Samuel Alexander Kinnier Wilson). Узрок ове болести је дефект гена *ATP7B* смештеног на 13 хромозому. Протеин *ATP7B* учествује у синтези ензима задуженог за екскрецију бакра из хепатоцита у интрахепатичне жучне канале. Болест се преноси аутозомно-рецесивно. Иако није доказано да бакар делује мутагено добро се на пример зна да функција редокс ензима

Мето који стимулише стварање ROS (енгл. Reactive Oxygen Species) зависи од бакра и то у ћелијским структурама одговорним за покретљивост и миграцију ћелија што се повезује са већим метастатским потенцијалом. Није доказано да је примена бакра повезана са канцерогенезом али је познато да учествује у (нео)ангиогенези и да доприноси бржем расту канцера. Захваљујући антиинфламацијском дејству, испитује се и његова примена у лечењу реуматских, као и неуродегенеративних обољења, попут Алцхајмерове и Паркинсонове болести. Неорганске соли бакра су токсичне, међутим јон бакра(II) услед непопуњених d орбитала може да награди велики број комплексних једињења мање токсичности и значајне биолошке активности. Тиосалицилна киселина и њени деривати представљају добре лиганде за координовање са јоном бакра(II) због присуства сумпора и кисеоника као донорских атома. Фарнезилтиосалицилна киселина може да инхибира раст ћелија хуманог и мишјег меланома. Показано је да ово једињење инхибира сигналне путеве који зависе од Ras протеина, а успорава и развој атеросклеротских плакова код мишева којима недостаје аполипопротеин. Испитује се и примена фарнезилтиосалицилне киселине као полимерног носача антитуморских лекова, што би довело до смањења њихове токсичности.

2.5. Значај и циљ истраживања

Одабир одговарајућег лиганда игра кључну улогу у реактивности и липофилности награђеног комплекса, стабилизацији одређених оксидационих стања метала, као и могућности супституције лиганда одговарајућим ендогеним молекулима. Имајући у виду горе наведено, циљеви истраживања су следећи:

1. Синтетисати S,O-тетрадентатне лиганде, деривате тиосалицилне киселине који у структури садрже етиленски-(L1), пропиленски-(L2), бутиленски-(L3) и пентиленски-(L4) мост, као и комплексе бакра(II) са наведеним тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине (C1-C4);
2. Потврдити састав синтетисаних једињења на основу резултата елементарне микроанализе;
3. Испитати структуре добијених лиганда и одговарајућих комплекса бакра(II) на основу резултата инфрацрвене спектроскопије, нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије и електронске-парамагнетне-резонанције;

4. Потврдити стварну структуру синтетисаних једињења на основу резултата рендгенске структурне анализе, у случају добијања монокристала;
5. Испитати интеракцију новосинтетисаних комплекса са молекулом гуанозин-5'-монофосфата, праћењем супституционих реакција при физиолошким условима. Такође, пратиће се и интеракција између синтетисаних комплекса и СТ-ДНК (енгл. *calf thymus*);
6. Испитати антимикуробну и антитуморску активност добијених тетрадентатних лиганата и одговарајућих комплекса бакра(II).

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашња истраживања у области хемије комплексних једињења показују да комплекси бакра(II) могу бити добри кандидати за нове антитуморске лекове. Бакар је есенцијални микроелемент који има значајну физиолошку улогу. Улази у састав многих ензима неопходних за анаеробни метаболизам. Комплекси бакра(II) показују антимикуробно, антитуморско и антиинфламацијско дејство. Бакар(II) јон се добро координује са лигандима који садрже азот, сумпор и кисеоник као донорске атоме. Тиосалицилна киселина је лиганд са кисеоником и сумпором као донорским атомима. Дериват тиосалицилне киселине, фарнезилтиосалицилна киселина, у фокусу је тренутних истраживања. Испитује се клиничка примена овог једињења у терапији карцинома. Такође, нова испитивања усмерена су и на примену фарнезилтиосалицилне киселине као носача антитуморских лекова. Циљ овог истраживања је да се синтезом комплекса бакра(II) и деривата тиосалицилне киселине добију комплекси који показују бољу биолошку активност уз смањење нежељених ефеката у поређењу са полазним једињењима.

2.7. Методе истраживања

Синтезе лиганата

Тетрадентатни лиганди, деривати тиосалицилне киселине добијају се реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-дихалогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу, што подразумева да се у раствор добијен растварањем (2,00mmol) тиосалицилне киселине у 50,00ml 30% етанола додаје раствор

натријум-хидроксида (2,00mmol у 5,00ml дестиловане воде). Затим се одговарајући алкил-дихалогенид (1,2-дихлоретан, 1,3-дихлорпропан, 1,4-дихлорбутан и 1,5-дихлорпентан) (1,00mmol) раствори у 5,00mL етанола и постепено додаје у малим порцијама у претходно припремљену бистру реакциону смешу. Тако добијена реакциона смеша остави се током ноћи на 60°C. Након тога раствор се пренесе у кристалizacionу шољу и упари на воденом купатилу ради удаљавања етанола. У добијени водени раствор додаје се (2,00mM) раствор хлороводоничне киселине услед чега се ствара бели талог одговарајућег деривата тиосалицилне киселине. Тако добијени производ се одвоји цеђењем, испере великом количином дестиловане воде и суши преко ноћи на вакууму. Монокристали погодни за рендгенску структурну анализу добијају се спором прекристализацијом из система диметилсулфоксид (DMSO)-вода.

Синтеза комплекса

Комплекси бакар(II) биће добијени директном реакцијом бакар(II)-нитрата трихидрата, тетраденатног лиганда деривата тиосалицилне киселине и литијум-хидроксида у молском односу 1:1:2. Раствору добијеном растварањем бакар(II)-нитрата трихидрата у дестилованој води лагано ће се додавати одговарајући тетраденатни лиганд. Реакциона смеша ће се загревати на воденом купатилу уз мешање током 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаваће се водени раствор литијум-хидроксида. Добијени талог комплекса ће се одвојити цеђењем, испрати дестилованом водом и сушити на ваздуху.

Елементална микроанализа

Елементална анализа (C, H, S) спроводи се на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer, на Катедри за органску хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду.

Инфрацрвена спектроскопија

Инфрацрвени спектри биће снимани помоћу спектрофотометра *Perkin Elmer FTIR 31725X* (KBr техника), на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

^1H и ^{13}C нуклеарно-магнетно-резонанционна спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра синтетисаних лиганата врши се помоћу спектрофотометра *Varian Gemini-200* NMR употребом D_2O . Наведена снимања спектра биће извршена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

Електронска-парамагнетна-резонанција

Спектри електронско-парамагнетне-резонанције (9,8GHz) снимаће се на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду употребом *Bruker Elexsys II 540 EPR* спектрофотометра. Узорци (30 μl , 0,5mM) се припремају растварањем комплекса у дејонизованој води (18 M Ω). Спектри се снимају и анализирају коришћењем *Bruker Xepc* софтвера.

Моларна проводљивост

Моларна проводљивост (Λ) свеже припремљених раствора комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима (концентрације $1 \cdot 10^{-3} \text{mol/dm}^3$) у диметилсулфоксиду као растварачу одређиваће се на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу EC-Meter BASIC 30+ кондуктометра (CRISON) на температури од 20°C.

Магнетна мерења

Магнетна мерења синтетисаних комплекса спроводе се на Хемијском факултету Универзитета у Београду на температури од 294K Евансовим методом коришћењем апарата MSB (Magnetic Susceptibility Balance) - MK1 (Scherwood Scientific Ltd., Cambridge England) са $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ као калибрантом.

Рендгенска структурна анализа

Рендгенска структурна анализа биће спроведена на Одсеку за хемију на FCT Nova Универзитету у Португалу анализом X-зрака.

Кинетичка мерења

Кинетика и механизам супституционих реакција комплекса бакра са изабраним лигандима изучаваће се на *Stopped-flow* спектрофотометру у 25mM *Hepes* пуферу, $pH \approx 7,2$, на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. За одређивање вредности константи користи се компјутерски програм *Microsoft Excell 2007* и *OriginPro 8*.

Интеракције комплекса са ДНК

Абсорпциона спектроскопска мерења. Интеракције комплекса са ДНК проучаваће се помоћу *Uv-Vis* спектрофотометрије у циљу одређивања константе везивања (K_b). Серија раствора комплекс-ДНК припрема се мешањем раствора комплекса константне концентрације (8 μ M) са инкрементима ДНК полазног раствора (1,2mM).

Флуоресцентна мерења. Интеракције комплекса са ДНК испитују се и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Интеракције комплекса са ДНК се проучавају у присуству етидијум бромид (ЕБ) да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕБ из његовог ДНК-ЕБ комплекса. Могући ефекти везивања комплекса за ДНК проучавају се снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса (0-80 μ M) у раствор ДНК-ЕБ.

Биолошка испитивања

***In vitro* антимикуробна активност**

Антимикуробна активност синтетисаних комплекса испитиваће се у лабораторији за микробиологију на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Антимикуробна активност комплекса испитаће се микродилуционом методом одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК) тестирањем 18 микроорганизама: три пробиотика, два клиничка изолата, две кваснице и седам филаментозних гљивица. Као позитивне контроле користе се тетрациклин и амфотерицин Б.

***In vitro* анти туморска активност**

Анти туморска активност добијених једињења биће спроведена у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу. Потенцијална антитуморска активност комплекса бакра(II) са тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине ће се испитати *in vitro* на туморским ћелијама карцинома колона НСТ-116 (АТСС® ССЛ-247™), карцинома плућа А549 (АТСС® ССЛ-185™) и карцинома дојке МДА-МВ-231 (АТСС® НТВ-26™). Цитотоксична активност синтетисаних једињења испитиваће се применом МТТ колориметријског теста.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Откриће потенцијалне антимикробне и антитуморске активности синтетисаних лиганата, као и одговарајућих комплекса бакра(II) са наведеним лигандима значајно је због будућих истраживања у области хемије комплексних једињења, нарочито уколико докажемо да наведена једињења поседују шири спектар деловања, уз мање нежељених дејстава у поређењу са референтним стандардима. Такође, потенцијална биолошка активност новосинтетисаних деривата тиосалицилне киселине може створити нову могућност за координовање са јонима других метала, при чему новосинтетисана координациона сфера може условити и бољу биолошку активност.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Бакар као есенцијални микроелемент са значајном биолошком активношћу представља добар метални јон за координовање са различитим лигандима, нарочито онима који садрже сумпор и кисеоник као донорске атоме. Тиосалицилна киселина је бидентатни лиганд, са сумпором и кисеоником као донорским атомима, па је зато добар лиганд за координовање са јонима прелазних метала. Фарнезилтиосалицилна киселина може да инхибира раст ћелија хуманог и мишијег меланома инхибицијом сигналних путева који зависе од Ras протеина. Испитује се и њена примена као полимерног носача антитуморских лекова, чиме би се смањила њихова токсичност. Ова докторска дисертација обухватиће синтезу четири S,O-тетрадентатна лиганата, деривата тиосалицилне киселине са етиленским-, пропиленским-, бутиленским- и пентилениским- мостом и комплексе бакра(II) са наведеним лигандима. Састав и структура синтетисаних једињења биће потврђени на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвене

спектроскопије, нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије, електронско-парамагнетне-резонанције, магнетних мерења и моларне проводљивости. Стварна структура синтетисаних лиганата и комплекса биће потврђена на основу резултата рендгенске структурне анализе, ако буде могуће да се добију монокристали. Истраживање ће обухватити и испитивање интеракција награђених комплекса са молекулом ДНК, као и испитивање антимикуробне и антитуморске активности синтетисаних једињења. Резултати овог рада могу представљати основу за наставак истраживања у области хемије комплексних једињења бакра, која су у сфери интересовања због бољег токсиколошког профила у поређењу са *цисплатином* (*cis*-диамминдихлоридоплатина(II)-комплекс), као и новосинтетисаних деривата тиосалицилне киселине у циљу координовања са јонима других метала.

3. Предлог ментора

За ментора. ове докторске дисертације се предлаже проф. др Гордана П. Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија.

Проф. др Гордана П. Радић 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

Радови проф. др Гордане П. Радић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Bukonjić AM, Tomović DLj, Stanković AS, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Milovanović JZ, Đorđević DB, Arsenijević AN, Milovanović MZ, Potočňák I, Trifunović SR, **Radić GP**. Synthesis, characterization and biological activity of copper(II) complexes with ligands derived from β -amino acids. *Transition Metal Chemistry* 2019; 44(1):66-76.
2. Tomović DLj, Bukonjić AM, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Đeković A, Radojević ID, Čomić LjR, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, **Radić GP**,

- Cupara S. DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transition Metal Chemistry* 2018; 43(2):137-48.
3. Bukonjić AM, Tomović DLj, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, Radojević ID, Maksimović JZ, Vasić SM, Čomić LjR, Trifunović SR, **Radić GP**. 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; 1128:330-337.
 4. Mijajlović MŽ, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Milovanović J, Arsenijević A, Stojanović B, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, **Radić GP**. Cytotoxicity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd(1,2- dpheddp)] complex. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2016; 35(1):79–86.
 5. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, Milovanović J, Arsenijević A, Stojanović B, Trifunović SR, **Radić GP**. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure* 2016; 1116:264-271.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Истраживања у фармацији.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области *Микробиологија и имунологија; Онкологија*, председник;
2. **Доц. др Јелена Пољаревић**, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;
3. **Проф. др Верица В. Јевтић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;

4. Доц. др Јована В. Богојески, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;

5. Др Ивана Д. Радојевић, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област *Биологија*, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

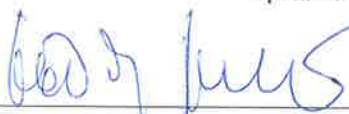
На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат Ана Станковић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Ане Станковић, под називом **„Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области *Микробиологија и имунологија; Онкологија*,

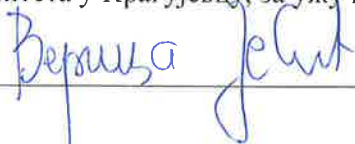
председник;



Доц. др Јелена Пољарсвић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду, за
ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;



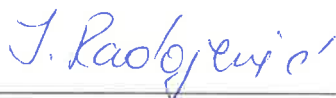
Проф. др Верица В. Јевтић, ванредни професор Природно-математичког факултета
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;



Доц. др Јована В. Богојески, доцент Природно-математичког факултета
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;



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



У Крагујевцу, 16.12.2019. године