

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

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 14.12.2017. godine, izabrani smo za članove Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Nikole R. Stevanovića, master hemičara, asistenta na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod naslovom:

„Polidentatne Šifove baze i njihovi Cu(II) kompleksi: lipofilnost i biološka aktivnost“

Na osnovu pregleda doktorske disertacije, Nastavno-naučnom veću podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Nikole Stevanovića napisana je na 122 strane i sastoji se iz sledećih delova: **Uvod** (2 strane), **Opšti deo** (31 strana), **Naši radovi** (63 strane), **Zaključci** (1 strana), **Literatura** (26 strana, 231 literaturni navod). Pored navedenog, rad sadrži i Izvod na srpskom i engleskom jeziku, Zahvalnicu, Sadržaj, Prilog sa etičkim dozvolama i biografiju doktoranda sa bibliografijom. U radu se nalaze ukupno 22 tabele i 39 slika.

U **Uvodu** kandidat daje kraći osvrt na oblast istraživanja i temu rada. Ciljevi teze su grupisani u četiri celine, koje su kasnije opisane u daljem tekstu: Ispitivanje uticaja organskog modifikatora na određivanje lipofilnosti, Ispitivanje uticaja supstituenata na predviđanje retencije Šifovih baza derivata β -diketona i njihovih kompleksa, Ispitivanje biološke aktivnosti, Vezujući afinitet Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin: eksperimentalni i teorijski pristup.

U **Opštem delu** kandidat je dao detaljan pregled literaturnih podataka o Šifovim bazama i njihovim kompleksima sa jonima metala, o njihovoj primeni u različitim oblastima hemije i u biološkim procesima, farmaciji, kao i o njihovoj biološkoj aktivnosti. Opisana su dosadašnja saznanja o lipofilnosti i značaju njenog određivanja primenom različitih hromatografskih metoda, kao i kvantitativna veza između strukture, aktivnosti i retencije molekula. Pored toga, kandidat, u ovom delu, daje pregled eseja za merenje vijabilnosti i proliferacije ćelija, evaluaciju apoptoze, kao i metoda za proučavanje protein-ligand interakcija.

Naši radovi su opisani u okviru 4 celine u kojima kandidat predstavlja rezultate svojih istraživanja. U prvom delu pod naslovom *Ispitivanje uticaja organskog modifikatora na određivanje lipofilnosti* je ispitivan uticaj organskog modifikatora na određivanje

lipofilnosti 21 Šifove baze primenom tankoslojne horizontalne normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije. Kao mobilne faze su primenjeni mono- i dvokomponentni organski modifikatori u smeši sa vodom. Izvršena je korelacija eksperimentalno određenih i izračunatih parametara lipofilnosti. U drugom delu pod naslovom *Ispitivanje uticaja supstituenata na predviđanje retencije Šifovih baza derivata β -diketona i njihovih kompleksa* je ispitivano hromatografsko ponašanje 12 Šifovih baza i 24 kompleksa Šifovih baza u uslovima normalno- i reverzno-fazne hromatografije u cilju utvrđivanja veze između mehanizama odvajanja u različitim hromatografskim sistemima i prisutnih supstituenata, koji su sukcesivno uvođeni u strukturu ispitivanih jedinjenja. Analiza glavne komponente je omogućila grupisanje jedinjenja na osnovu hromatografskog ponašanja, kao i povezivanje hromatografskog ponašanja sa strukturnim karakteristikama jedinjenja koje su definisane izračunatim molekulskim deskriptorima. U trećem delu pod naslovom *Ispitivanje biološke aktivnosti* je određena antimikrobna aktivnost Šifovih baza i njihovih Cu(II) kompleksa (izražena kao minimalna inhibitorna koncentracija) na *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* i *C. albicans*. Pored toga, ispitivan je i citotoksični efekat Cu(II) kompleksa Šifovih baza. Urađeni su eseji za merenje vijabilnosti ćelija na ćelijama raka debelog creva (Caco-2), i ispitan je apoptopski efekat uz poređenje uticaja na Caco-2 i mononuklearnim ćelijama iz pune krvi zdrave osobe. U četvrtom delu pod naslovom *Vezujući afinitet Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin: eksperimentalni i teorijski pristup* je opisano određivanje afiniteta vezivanja Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin (HSA). Opisana je primena fluorescentne spektroskopije za praćenje interakcija ispitivanih jedinjenja i HSA. Gašenje emisije triptofana na 340 nm je primenjeno za određivanje jačina interakcija između proteina i jedinjenja primenom Stern-Volmerove jednačine i analize ovih podataka. Intenzitet gašenja emisije, prikazan kao linearna zavisnost odnosa F_0/F i koncentracije ispitivanih kompleksa, je omogućila određivanje Stern-Volmer-ovu konstante, K_{sv} . Utvrđen je mehanizam gašenja fluorescencije i pored K_{sv} određeni su i drugi parametri vezivanja ispitivanih kompleksa za HSA (K_D , K_a i n). Pored toga, promene sekundarne strukture proteina, pri vezivanju kompleksa za HSA, su ispitivane pomoću CD spektrometrije, pri čemu je primenjen različit molski odnos proteina i ispitivanog jedinjenja. Na kraju je metodama molekulskog modelovanja i molekulskog dokinga, utvrđeno mesto vezivanja ispitivanog jedinjenja za humani serum albumin. Svi dobijeni rezultati, prikazani u delu Naši radovi, su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

U okviru odeljka **Zaključci** ukratko su sumirani svi dobijeni rezultati i iznet je njihov značaj.

Literatura sadrži 232 literaturna navoda prema abecednom redosledu prezimena autora.

B. Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivana lipofilnost i biološka aktivnost Šifovih baza i njihovih kompleksa. Set ispitivanih jedinjenja, kao pažljivo odabran model sistem, omogućio je ispitivanje efekta supstituenata i strukture molekula na lipofilnost molekula i ispoljenu biološku aktivnost. U model sistemu je izvršena postupna supstitucija metil-grupa fenil- i/ili trifluorometil-grupama, kao i fenil-grupa trifluorometil-grupama. Pored toga ispitivani set jedinjenja sadrži dve serije jedinjenja koje se međusobno razlikuju u strukturi diaminskog mosta, u kome se nalaze etilendiamin ili propilendiamin. Utvrđen je uticaj primenjenih

organskih modifikatora na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja, kao i na određivanje parametara lipofilnosti. Utvrđeno je da primenom određenog modifikatora molekul može da ispolji lipofilnost, koja odgovara onoj koju bi ispoljio u realnom okruženju, kao što je prolazak kroz ćelijsku membranu. Pri ispitivanju hromatografskog ponašanja posmatranih jedinjenja, ispitivan je uticaj različitih supstituenata na retenciju u uslovima normalno- i reverzno-fazne hromatografije, kao i na predviđanje retencije, a samim tim i na određivanje lipofilnosti, primenom hromatografskih metoda.

Takođe, za ispitivana jedinjenja, utvrđeni su molekularni deskriptori koji najbolje opisuju promenu osobina molekula usled sukcesivnog uvođenja različitih supstituenata u strukturu jedinjenja i promene u strukturi diaminskog mosta, kao i njihov uticaj na lipofilnost. Na osnovu ovih rezultata, utvrđeno je da voluminozni supstituenti sa izraženim induktivnim efektom povećavaju lipofilnost, kao i da uvođenje trifluorometil-grupa dovodi do povećanja lipofilnosti jedinjenja. Takođe, diaminski most koji sadrži propilensku grupu doprinosi većoj hidrofobnosti. Određen je kvantitativni odnos strukture i retencije (QSRR), kao i strukture i aktivnosti (QSAR) i razvijeni su odgovarajući modeli na osnovu molekularnih deskriptora izračunatih za date strukture, kao i eksperimentalno određenih parametara retencije i parametara lipofilnosti.

Na osnovu određene antimikrobne aktivnosti utvrđeno je da su ispitivani kompleksi pokazali značajno bolju aktivnost u poređenju sa odgovarajućim Šifovim bazama, što je u skladu sa eksperimentalno određenim parametrima lipofilnosti. Na osnovu dobijenih rezultata, za dalja istraživanja na ćelijama odabrana su jedinjenja koja su pokazala najraznovrsniju antimikrobnu aktivnost: bis(acetilacetonato)etilendiamin Cu(II) kompleks, bis(acetilacetonato)propilendiamin Cu(II) kompleks, bis(benzoilacetonato)etilendiamin Cu(II) kompleks i bis(trifluoroacetilacetonato)propilendiamin Cu(II) kompleks. U cilju određivanja citotoksičnosti kompleksa Šifovih baza i njihovih IC₅₀ vrednosti na kancerškoj ćelijskoj liniji Caco-2 urađen je MTT esej. Takođe, ispitivan je apoptotski efekat izabranih kompleksa Šifovih baza, kao i poređenje njihovog uticaja na zdrave i kancerške ćelije. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da nijedan od ispitivanih kompleksa ne dovodi do nekroze ćelija, već ih uvodi u programiranu ćelijsku smrt. Svi ispitivani kompleksi izuzev bis(trifluoroacetilacetonato)propilendiamin Cu(II) kompleksa su pokazala citotoksičnost prema Caco-2 kancerškim ćelijama, kao i da pri istim koncentracijama ne utiču na zdrave ćelije. Kompleks sa najvećim proapoptotskim efektom na kancerškim ćelijama je pokazao i stabilišući efekat prema zdravim ćelijama. Takođe, utvrđen je uticaj strukture na citotoksičnost datih jedinjenja.

Vezujući afinitet Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin je ispitivan na onim jedinjenjima koja su pokazala citotoksični efekat na kancerškim ćelijama. U okviru ovih ispitivanja je utvrđeno da kompleksi sa polidentatnim Šifovim bazama imaju visoki afinitet vezivanja za HSA, da postoji jedno vezivno mesto, kao i da vezivanjem ovih kompleksa dolazi do minornih promena u sekundarnim strukturama proteina koje, u nekim slučajevima, čak dovode i do stabilizacije proteina. Utvrđeno je da je mehanizam fluorescentnog gašenja Trp₂₁₄ statički, određene su konstante vezivanja (K_a) i broj mesta vezivanja (n), kao i drugi parametri vezivanja ispitivanih kompleksa za HSA (K_{sv}, K_D). Doking studija za ispitivani bis(acetilacetonato)propilendiamin Cu(II) kompleks, sa najvećim proapoptotskim efektom na kancerškim ćelijama, potvrdila je eksperimentalno određen broj

vezivnih mesta kompleksa za HSA i odredila da je mesto vezivanja u subdomenu IB. Rezultati su pokazali da se HSA može smatrati mogućim nosiocem ispitivanog Cu(II) kompleksa do ciljnih ćelija. Informacija o uticaju strukture na mesto vezivanja i eventualne promene u stabilnosti bi omogućila ciljne sinteze novih, bioloških aktivnih jedinjenja, sa poboljšanim osnovnim karakteristikama i krajnjim efektom dejstva.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Biološki aktivne Šifove baze predstavljaju potencijal za primenu u farmaciji i medicini, tako da je izuzetno aktuelno ispitivanje mehanizama ispoljavanja njihove lipofilnosti, koja je jedan od preduslova ulaska u sistem gde će ispoljiti svoj biološki efekat. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti zavisi od velikog broja parametara. U postupku dizajniranja novih lekova uvek je važno utvrditi osnovne karakteristike supstanci među kojima je i lipofilnost. Rezultati dobijeni pri izradi ove doktorske disertacije, nakon ispitivanja različitih efekata koji mogu da utiču na postupak određivanja lipofilnosti, omogućavaju pronalaženje optimalnih uslova za eksperimentalno određivanje ovog parametra, pri kojima bi došla da izražaja lipofilnost ispitivanog molekula koju bi on ispoljio u uslovima prolaska kroz ćelijsku membranu tj. u realnom okruženju. U uslovima reverzno-fazne hromatografije, u postupku optimizacije, uloga organskog modifikatora pri ispitivanju Šifovih baza i njihovih kompleksa nije bila do sada dovoljno ispitana. Zbog toga su u okviru ove disertacije ispitivanja urađena na različitim klasama strukturno sličnih, kao i strukturno različitih jedinjenja, u cilju određivanja faktora koji uslovljavaju ispoljavanje određene biološke aktivnosti (antikancerske, citotoksičnosti i sl), način vezivanja, stabilnost vezanja u realnom sistemu za određene proteine, kao i promene do kojih dolazi i na ispitivanom jedinjenju i na proteinu za koji se vezuje. Albumin iz humanog seruma je ne samo najzastupljeniji protein u krvnoj plazmi, već i značaj regulator biodostupnosti i farmakokinetike brojnih endogenih i egzogenih liganada koje vezuje i prenosi kroz sistemsku cirkulaciju. Brojne studije su poslednjih godina okarakterisale vezivanje velikog broja bioaktivnih supstanci za HSA, ali ne i jedinjenja tipa Šifovih baza i njihovih kompleksa. Definisanje mesta i načina vezivanja ispitivanih Šifovih baza i njihovih kompleksnih jedinjenja, kao i strukturnih promena do kojih pri tome dolazi, omogućava efikasniju kontrolu njihove distribucije i ispoljavanje biološku aktivnost u živim sistemima. Na kraju, dobijene i potvrđene informacije o uticaju strukture na mesto vezivanja i eventualne promene u stabilnosti nastalog kompleksa, omogućavaju ciljne sinteze novih, bioloških aktivnih jedinjenja tipa Šifovih baza, sa poboljšanim osnovnim karakteristikama i krajnjim efektom dejstva.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo teze

Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u dva rada štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima (M22), u dva saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampanom u izvodu (M34) i u jednom saopštenju na skupu nacionalnog značaja štampanom u izvodu (M64).

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M22):

Danica S.Perušковиć, Branka Darić, Anita Blagus, Nikola R.Stevanović, Aleksandra V.Pavlović, Aleksandar Đ.Lolić and Rada M.Baošić, Influence of organic modifiers on RPTLC determination of lipophilicity of some polydentate Schiff bases, Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 146 (1), 1-6, 2015, DOI:10.1007/s00706-014-1313-7 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00706-014-1313-7.pdf>

Nikola R. Stevanović, Danica S. Perušković, Uroš M.Gašić, Vesna R.Antunović, Aleksandar Đ.Lolić, Rada M. Baošić, Effect of substituents on prediction of TLC retention of tetradentate Schiff bases and their Copper(II) and Nickel(II) complexes, Biomedical Chromatography, 31 (3), e3810, 1-8, 2017, DOI:10.1002/bmc.3810 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.3810/epdf>

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):

Nikola R.Stevanović, Anita Blagus, Aleksandar Lolić, Maja Natić, Živoslav Tešić, Rada Baošić, RPTLC determination of lipophilicity parameters of polydentate Schiff bases obtained from o-hydroxyaryl aldehydes and ketones with aromatic diamines, XXXVthSymposium Chromatographic Methods of investigating the organic compounds, Katowice-Szczyrk, Poljska, p.19, 2012.

Nikola R.Stevanović, Danica S.Perušковиć, Aleksandar Đ.Lolić, Snežana D.Mandić, Rada M.Baošić, Chromatographic behavior of tetradentate Schiff base and corresponding Copper(II) and Nickel(II) complexes by NP- and RP-TLC, 9th Aegean Analytical Chemistry Days, Book of Abstracts, p.4-9, 2014.

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64):

Danica S.Perušковиć, Branka Darić, Anita Blagus, Nikola R.Stevanović, Aleksandar Đ.Lolić and Rada M.Baošić, Influence of organic modifiers on RPTLC determination of lipophilicity of some polydentate Schiff bases, 51st Meeting of the Serbian Chemical Society, Book of Abstracts, p.15, 2014.

E. Zaključak Komisije

Komisija je na osnovu detaljnog pregleda doktorske disertacije Nikole Stevanovića pod naslovom: „Polidentatne Šifove baze i njihovi Cu(II) kompleksi: lipofilnost i biološka aktivnost“, zaključila da je kandidat uspešno odgovorio na sve postavljene zadatke i ciljeve.

U okviru ove disertacije na odabranom setu posmatranih jedinjenja ispitivan je uticaj organskog modifikatora na određivanje lipofilnosti, uticaj supstituenata, uticaj njihove postupne zamene i uticaj promena u strukturi diaminskog mosta na predviđanje retencije Šifovih baza derivata β-diketona i njihovih kompleksa, i utvrđeni su molekularni deskriptori koji najbolje opisuju karakteristike jedinjenja koje su odgovorne na ispoljavanje navedenih uticaja. Pored toga, određena je antimikrobna aktivnost i citotoksičnost, ispitan je apoptotski efekat, i eksperimentalno i teorijski je ispitivan vezujući afinitet Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin. Rezultati dobijeni pri izradi ove doktorske disertacije mogu imati značajnu primenu, jer ispitivanje i definisanje svih navedenih efekata koji utiču na eksperimentalno određene parametre lipofilnosti ispitivanih Šifovih baza i njihovih Cu(II) kompleksa, kao i definisanje uticaja strukture na mesto vezivanja i na eventualne promene u

stabilnosti nastalog kompleksa ispitivanog jedinjenja i proteina, omogućavaju ciljne sinteze novih, biološki aktivnih jedinjenja tipa Šifovih baza, sa poboljšanim karakteristikama i krajnjim efektom dejstva.

Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u dva rada štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima (M22), u dva saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampanom u izvodu (M34) i u jednom saopštenju na skupu nacionalnog značaja štampanom u izvodu (M64).

Komisija smatra da rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti analitičke hemije i da se u potpunosti uklapaju u savremene trendove ove naučne discipline.

Na osnovu svega izloženog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da podnetu doktorsku disertaciju Nikole Stevanovića, pod naslovom: „**Polidentatne Šifove baze i njihovi Cu(II) kompleksi: lipofilnost i biološka aktivnost**“, prihvati i odobri njenu odbranu.

Komisija:

dr Rada Baošić, vanredni profesor, mentor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

dr Živoslav Tešić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

dr Mario Zlatović, vanredni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Danijela Apostolović, naučni saradnik,
researcher, Department of Medicine,
Solna Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

dr Slaviša Stanković, redovni profesor
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Sandra Arandžević, viši naučni saradnik
Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

U Beogradu, 15. 12. 2017. godine