

Датум издања		30.08.18	
Својств	Својств	Класификација	
05	3793/4-4		

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-03-97/32, од 07.02.2018. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Иване Раковић, под називом:

„Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник
2. **Проф. др Драган Микић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Инфективне болести, члан
3. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Ивана Раковић 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

Ивана (Радисав) Раковић, доктор медицине, рођена је 12. 08. 1983. године у Крагујевцу где је завршила основну и средњу школу са одличним успехом. Медицински факултет у Крагујевцу је уписала 2002. године, а дипломирала 2009. године са просечном оценом 8,35 (осам и 35/100). Након завршених студија, обавила је редован лекарски стаж и положила стручни испит јуна 2010. године. Школске 2011/12. године уписала је прву годину докторских академских студија, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфламација и инфекција. Усмени докторски испит је положила у октобру 2013. године. Од септембра 2010. до фебруара 2013. године је обављала волонтерски рад на Клиници за инфективне болести Клиничког центра Крагујевац, након чега је примљена у стални радни однос. Маја 2013. године је уписала специјализацију из Инфектологије. Јануара 2012. године је први пут изабрана у звање сарадника у настави, а 2014. године је изабрана у звање истраживач-сарадника за ужу научну област Инфективне болести Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Активно учествује у извођењу практичног дела наставе на ИАСМ, ИАСС, ИАСФ, ОСС као и у организацији рада катедре за Инфективне болести. Била је ангажована као истраживач на јуниор пројекту „Анализа фактора значајних у диференцијалној дијагнози узрочника фебрилних стања непознате етиологије”.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Испитивање антимикуробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса“

Предмет: Задатак овог истраживања је испитивање потенцијалне антимикуробне, антибиофилм, антиоксидативне активности и интеракције са молекулом СТ-ДНК комплекса паладијум(II)-а.

Хипотеза: Паладијум(II) комплекси показуће исту или бољу антимикуробну активност у односу на позитивне контроле (антибиотике и антигљивичне лекове) и у задовољавајућем степену интераговаће са СТ-ДНК молекулом, при чему ће градити стабилне производе.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у рецензираном часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву теме докторске дисертације:

Rakovic I, Popovska Jovicic B, Bukonjic A, Petrovic S, Canovic P, Hamzagic N. The analysis of risk factors and clinical demographic characteristics of patients with clostridium difficile infection as well as the outcome of their treatment. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17(2): 139-43. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Појава све чешће резистенције микроорганизама на антибиотике и антигљивичне лекове је озбиљан проблем који се јавља широм света. Осим резистенције, проблем представља и већа отпорност Gram- негативних бактерија у односу на Gram- позитивне према дејству различитих антимикуробних супстанци, а која се приписује сложенијој структури њиховог ћелијског зида. Улажу се све већи напори на откривању нових антимикуробних супстанци, а међу њима се посебно посвећује пажња испитивању активности новосинтетисаних комплексних једињења са различитим јонима метала.

Истраживања показују да фармаколошка активност комплекса паладијум(II) углавном зависе од природе лиганда, различити лиганди показују различиту биолошку активност. Комплекси паладијум(II)-а са антибиотцима из групе тетрациклина бележе повећану антимикуробну активност у односу на тетрациклин, према бактеријским сојевима *Escherichia coli* (16 пута), док комплекс истог јона метала са флуорохинолоном показује значајну активност према вирулентним сојевима *Mycobacterium tuberculosis*. Наведени комплекси са дериватима тиосалицилне киселине као лигандима имају статистички значајно већу антифунгалну активност према гљивама из рода *Aspergillus* у односу на контролу (флуконазол). Такође је установљено је да метални комплекси са терпиридином као лигандом показују бољу антимикуробну активност према бактеријама *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae* у односу на гентамицин. Нови концепт у унапређивању бактерицидног ефекта комплекса паладијум(II) са различитим лигандима заснива се на испитивању липофилности добијених једињења. Повећањем липофилности побољшава се продор комплекса ка циљаном месту у микроорганизму.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Откриће потенцијалне антимикуробне, антибиофилм, антиоксидативне активности и интеракције са СТ-ДНК (ДНК изолована из крављег тимуса) комплекса паладијум(II)-а је битан предуслов за подстицање даљих истраживања у области координовања паладијума са лигандима од фармаколошког значаја. Даљим истраживањем повећава се могућност проналажења комплекса који ће имати шири спектар дејства у медицинској примени са прихватљивим крајњим исходом лечења.

Циљ студије

Генерални циљ истраживања је испитивање потенцијалне антимикуробне, антибиофилм, антиоксидативне активности и интеракције са молекулом СТ-ДНК комплекса паладијума(II):

1. $[Pd(terpy)Cl]Cl$ - терпиридинхлоридопаладијум(II)-хлорид
2. $[Pd(en)Cl_2]$ - етилендиаминдихлоридопаладијум(II)

3. $[\text{Pd}(\text{ImCH}_3)\text{Cl}_2]$ - (N-(1,3-диизопропил-4,5-диметилимидазол-2-илидин)-N',N'-диметилетилендиамин)дихлоридопаладијум(II)
4. $[\text{Pd}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ - 1,2-диаминоциклохександихлоридопаладијум(II)

Специфични циљеви су:

1. Одређивање минималне инхибиторне (МИК) и минималне бактерицидне (МБК) односно фунгицидне концентрације (МФК) испитиваних комплекса и њихових лиганда.
2. Одређивање биофилм инхибиторне концентрације (БИК) оних комплекса који показују одређен степен антимикуробне активности.
3. Одређивање антиоксидативне активности испитиваних комплекса DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) методом, одређивањем IC_{50} .
4. Испитивање интеракције изучаваних комплекса са СТ-ДНК, утврђивање стабилности нагрђеног производа.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Претраживањем доступних база података 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 били потенцијално селективнији према циљаним местима деловања у бактеријским и гљивичним ћелијама. Селективно дејство на микроорганизме значајно би допринело повећању биолошке активности, смањењу броју нежељених дејстава, редукцији доза лека и смањеној резистенци.

Прегледом до сада публикованих резултата утврђено је да се истраживачи нису бавили синтезом комплекса паладијум(II) са 2,2':6',2''-терпиридин (terpy), етилендиамин (en), транс-1,2-диаминоциклохексан (dach), (N-(1,3-диизопропил-4,5-диметилимидазол-2-илидин)-N',N'-диметилетилендиамин (ImCH₃) као лигандима. Такође није испитивана потенцијална антимикуробна, антиоксидативна активност као ни интеракција наведених једињења са молекулом СТ-ДНК, што оставља могућност за будућа истраживања.

2.7. Материјал и методе:

2.7.1 Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на микроорганизмима и молекулу СТ-ДНК, *in vitro*.

2.7.2. Популација која се истражује

Синтезе лиганата

Лиганди: 2,2':6',2''-терпиридин (terpy), етилендиамин (en), транс-1,2-диаминоциклохексан (dach) набављени су од Fluka, AcrosOrganics или Sigma-Aldrich и коришћени су без предходног пречишћавања. Лиганд (N-(1,3-диизопропил-4,5-диметилимидазолин-2-илидин)-N',N'-диметилетилендиамин (ImCH₃) је синтетисан по раније публикованим поступку.

Синтезе комплекса

Комплекси: [Pd(terpy)Cl]Cl, [Pd(en)Cl₂], [Pd(ImCH₃)Cl₂], [Pd(dach)Cl₂] су синтетисани по раније публикованим поступцима. Чистоћа добијених једињења потврђена је елементарном анализом, IR (инфрацрвена спектроскопија), Uv-Vis спектрофотометријом и ¹H NMR (нуклеарно-магнетно-резонанционна) спектроскопијом.

In vitro антимикуробна активност

Антимикуробна активност паладијум(II)-комплекса обухватиће испитивање на бактеријама, квасцима и филаментозним гљивама. Истраживање ће бити спроведено на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Антимикуробна активност комплекса биће одређена тестирањем на 18 врста микроорганизама од чега 8 врста бактерија (*Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*), 3 квасца (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces boulardii*) и 7 врста филаментозних гљива (*Penicillium italicum*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor mucedo* ATCC 52568, *Trichoderma viride* ATCC 13233, *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus niger* ATCC 16404).

In vitro антибиофилм активност

Паладијум(II) комплекси који су показали одређен степен антимикуробне активности микродилуционом методом биће коришћени за испитивање антибиофилм активности. Антибиофилм активност биће одређена на већ формираном биофилму следећих бактерија: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 12453 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2.7.3. Узорковање

Бактеријске суспензије и суспензије гљива биће припремљене тако што ће се колоније узимати директно са подлоге и суспендовати у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије ће се подешавати коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan), при чему ће се вршити упоређивање са 0,5 McFarland стандардом. Почетне суспензије ће се

додатно разблажити у 0,85% стерилном физиолошком раствору у односу 1:100 за бактерије и квасце, а у односу 1:1000 за филаментозне гљиве.

Антимикробна активност биће одређена минималном инхибиторном концентрацијом (МИК) и минималном бактерицидном (МБК) односно фунгицидном концентрацијом (МФК), микродилуционом методом уз помоћ ресазурина. Биће коришћена плоча са 96 отвора у које ће бити стављено по 100 μL хранљиве подлоге, Muller-Hinton бујон за бактерије и Sabouraud dextrose бујон за гљиве. По 100 μL раствора испитиваних једињења почетне концентрације 2000 $\mu\text{g/mL}$ биће додато у први ред микротитрационе плоче. Двоструким разблажењем коришћењем мултиканалних пипета биће добијени раствори концентрација ранга од 1000 до 7,81 $\mu\text{g/mL}$. У сваки бунарић ће се затим додати по 10 μL суспензија бактерија, квасца или спора филаментозних гљива. Тестирана једињења ће бити испитана при концентрацији бактерија од 10^5 CFU/mL (Colony-Forming Unit) и концентрацији спора гљива од 10^3 CFU/mL. Потом ће се у сваки бунарић додати по 10 μL ресазурина, који је индикатор хелијског раста. Тако припремљене плоче биће инкубирани на 37°C током 24 сата за бактерије, на 28°C током 48 сати за квасце и 72 сата за филаментозне гљиве. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) за бактерије и квасце биће дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у ружичасту. Код филаментозних гљива МИК биће дефинисан као најнижа концентрација испитиваних супстанци где није уочен видљив раст мицелија. Минимална бактерицидна (МБК) односно фунгицидна концентрација (МФК) биће одређена пресејавањем по 10 μL узорка из бунарића у којима није уочен раст на плочаст агар. Концентрација на којој после периода инкубације не буде уочен раст биће дефинисана као минимална бактерицидна односно фунгицидна концентрација. Као позитивне контроле биће коришћени антибиотици (тетрациклин, цефтриаксон и ванкомицин) и антигљивични лекови (кетоконазол, флуконазол и амфотерицин Б). Како би се искључио ефекат растварача (диметилсулфоксида) на раст микроорганизама пратиће се његов утицај у концентрацији од 10%. Сваки експеримент садржаће контролу раста (присуство и раст бактерија без тестираних супстанци), контролу стерилности (подразумева одсуство живих бактерија) и позитивну контролу (антибиотик односно антигљивични лекови).

2.7.4. Варијабле

Интеракције комплекса са ДНК

Апсорпциона спектроскопска мерења

Апсорпциона мерења су вршена у фосфатном пуферу (0,01 М, рН = 7,4). Серија раствора комплекс-ДНК је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације са инкрементима ДНК полазног раствора (2,5 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 биће мерен на таласној дужини ексцитације (527 nm), а флуоресцентне емисије између 610 и 615 nm. Да би установили да ли наш комплекси могу да замене ЕБ (етидијум–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 μM) у раствор ДНК-ЕБ.

Антиоксидативна активност *in vitro*

Антиоксидативна активност биће одређивана коришћењем DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)) методе. Антиоксидативна активност биће изражена као проценат инхибиције, а израчунаће се коришћењем следеће једначине:

Активност неутрализације радикала (%) = $100 \cdot [(A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}}]$

при чему је $A_{\text{контрола}}$ апсорбанца контроле, а $A_{\text{узорак}}$ апсорбанца тестираног узорка

IC_{50} вредност биће дефинисана као ефективна концентрација тестиране супстанце на којој ће бити неутралисано 50% DPPH радикала.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публикованих истраживања. За прорачун је коришћен t-тест за независни узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма.

2.7.6. Статистичка обрада података.

За статистичку обраду резултата користиће се статистички програм *SPSS 20.0 for Windows*:

1. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
2. За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, (у зависности од величине узорка) и графици: хистограм и *normal QQ plot*.

За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов t-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

На основу досадашњих истраживања очекује се да ће паладијум(II) комплекси показати значајну антимикуробну активност, као и да ће доћи до интеракције комплекса са СТ-ДНК. Сматрамо да ће комплекси паладијум(II)-а показати бољу антимикуробну активност у односу на лиганде, што се може приписати координацији лиганата за јон метала и хелатном ефекту. Постојање биолошке активности омогућило би даља истраживања ових комплекса у циљу проналаска потенцијалних фармакотерапеутика и такође усмерило испитивања у области координације паладијума са фармаколошки активним лигандима.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Истраживања за сада показују да својства комплекса паладијума углавном зависе од природе лиганда. Утврђено је да комплекси паладијум(II) са различитим лигандима показују значајну биолошку активност, али студије у којима је испитивана активност овог јона метала са: 2,2':6',2''-терпиридин (terpy), етилендиамин (en), транс-1,2-диаминоциклохексан (dach), (N-(1,3-диизопропил-4,5-диметилимидазолин-2-илидин)-N',N'-диметилетилендиамин (ImCH₃), као лигандима нису пронађене. Дисертација је усмерена ка испитивању потенцијалне антимикуробне, антибиофилм и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса као и интеракције са молекулом СТ-ДНК. Након синтезе наведених комплекса по раније публикованим поступцима и утврђивања чистоте добијених једињења елементарном анализом, IR, Uv-Vis спектрофотометријом и ¹H NMR спектроскопијом, испитаћемо њихову потенцијалну антимикуробна активност на бактерија, квасцима и филаментозним гљивама. Комплекси који покажу одређен степен антимикуробне активности биће коришћени за испитивање антибиофилм активности. Истраживањем је планирано одређивање антиоксидативне активности DPPH методом, одређивање IC₅₀, као и испитивање интеракција изучаваних комплекса са СТ-ДНК, и утврђивање стабилности наглађеног производа. Сва истраживања ће бити спроведена у за то референтним установама и уз поштовање одговарајућих протокола. Постојање биолошке активности омогућило би даља истраживања ових комплекса у циљу проналаска потенцијалних фармакотерапеутика и такође усмерило испитивања у области координације паладијума са фармаколошки активним лигандима.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже проф. др Предраг Чановић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести. 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

1. Popovska-Jovicić B, **Canović P**, Gajović O, Raković I, Mijailović Z. Fever of unknown origin: Most frequent causes in adults patients. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73(1): 21-5.
2. Jakovljević M, Mijailović Z, Jovović BP, **Canović P**, Gajović O, Jovanović M, Petrović D, Milovanović O, Djordjević N. Assessment of viral genotype impact to the cost-effectiveness and overall costs of care for PEG-interferon-2 α + ribavirine treated chronic hepatitis C patients. *Hepat Mon.* 2013; 13(6): e6750.
3. Djordjević Z, Lazić Z, Gajović O, **Čanović P**, Todorović Z, Mijailović Ž, Bukumirić Z, Stolić R. [Risk factors for acute respiratory distress syndrome development in patients with type A influenza (H1N1)]. *Srp Arh Celok Lek.* 2012; 140(7-8): 441-7.
4. Petrović D, Mijailović Z, Popovska B, **Canović P**. Assessment of patient eligibility for kidney transplant procedure. *Med Glas (Zenica).* 2012; 9(2): 174-9.
5. Gajović O, Tomović M, Stanarčić J, **Canović P**, Todorović Z, Lazić Z. Clinical characteristics of nosocomial infections of patients with acute central nervous system infections treated in ICU. *Med Glas (Zenica).* 2011; 8(2): 277-9.
6. Mijailović Z, **Canović P**, Todorović Z, Gajović O, Nesić L, Djordjević Z, Mijailović J, Petrović D. Characteristics of radiological changes in lungs during varicella zoster viral infection. *Med Glas (Zenica).* 2011 Aug;8(2):280-3.
7. Gajović O, Todorović Z, Mijailović Ž, **Čanović P**, Nešić Lj, Đorđević Z, Stanojević M, Lazić Z. Incidenca, faktori rizika i ishod bolničkih pneumonija kod obolelih sa infekcijama centralnog nervnog sistema. *Srp Arh Celokup Lek* 2011; 139(7-8): 476-480.
8. Bugračić ZD, Soldatović T, **Canović P**, Nikolić R, Jelić R. Equilibrium and 1H NMR kinetic study of the reactions of dichlorido [S-methyl-L-cysteine (N,S)] platinum(II) complex with some relevant biomolecules. *Journal of Solution Chemistry* 2009; 8: 57-71.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник
2. **Проф. др Драган Микић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Инфективне болести, члан
3. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове кандидата Иване Раковић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

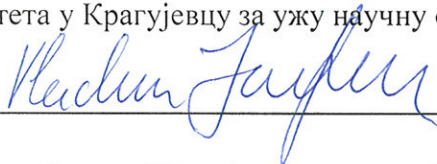
Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита антимикуробну, антиоксидативну активност као и интеракцију са СТ-ДНК паладијум(II) комплекса.

Комисија сматра да ће предложена докторска теза кандидата Иване Раковић бити од великог научног, практичног и потенцијално клиничког значаја.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Иване Раковић са називом „Испитивање антимикуробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

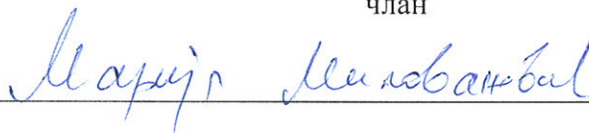
1. Проф. Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник



2. Проф. др Драган Микић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Инфективне болести, члан



3. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан



У Крагујевцу, 09. 02. 2018. године