

**Nastavno-naučnom veću
Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu**

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 10. decembra 2009. godine, određeni smo u komisiju za pregled i ocenu doktorske disertacije Irene Novaković, istraživača-saradnika Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centra za hemiju, Univerziteta u Beogradu prijavljene pod nazivom:

**„Proučavanje interakcija biološki aktivnog hinona avarona i njegovih
derivata sa lizozimom, linearnom i cirkularnom
dezoksiribonukleinskom kiselinom”**

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Irene Novaković pod navedenim naslovom napisana je na 129 strana A4 formata (prored 1,5) i sadrži 46 slika, 14 shema i 19 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: **1. Uvod** (1 strana), **2. Opšti deo** (24 strane), **3. Naši radovi** (57 strana), **4. Eksperimentalni deo** (20 strana), **5. Zaključak** (5 strana) i **6. Literatura** (98 citata). Pored toga, disertacija sadrži izvod na srpskom i engleskom jeziku (po dve strane), sadržaj, zahvalnicu, prilog i biografiju kandidata.

U **Uvodu** je dat kraći osvrt na oblast istraživanja i temu rada sa osnovnim ciljevima doktorske disertacije.

U **Opštem delu** ukratko su predstavljena najznačajnija antitumorska jedinjenja koja u molekulu poseduju hinonsku strukturu kao i generalni mehanizmi njihovog dejstva. Pored toga, kandidat opisuje moguće promene na molekulima proteina i DNA pod dejstvom hinonskih jedinjenja. U ovom delu su opisani i neki hinoni i hidrohinoni iz morskih organizama a dat je i prikaz biloške aktivnosti hinon/hidrohinonskog para avaron/avarol izolovanog iz morskog sundjera *Dysidea avara*.

U poglavlju **Naši radovi** predstavljene su sinteze i karakterizacije sintetisanih derivata avarona: 4'-(metilamino)-avarona, 3'-(metilamino)-avarona, 3'-metoksi-avarona kao i model jedinjenja 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)-avarona. Za sintetisane derivate avarona dati su rezultati i diskusija antibakterijskog dejstva prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama kao i prema sojevima gljivica. Predstavljene su i objašnjeni rezultati *Brine shrimp* testa toksičnosti kao i rezultati antioksidativne aktivnosti. Svim hinonskim derivatima ispitana je antitumorska aktivnost na osam vrsta ćelija raka kao i citotoksičnost prema limfocitima (PBMC). Dobijeni rezultati antitumorske aktivnosti su detaljno diskutovani i upoređeni sa aktivnostima komercijalnih antitumorskih agenasa. Hinonskim derivatima je hemijski modifikovan enzim lizozim. Modifikacija je praćena UV/Vis spektrofotometrijom, SDS elektroforezom i masenom spektrometrijom, dok je čistoća dobijenih modifikata praćena HPLC hromatografijom. Mesto vezivanja hinonskih derivata za molekul lizozima određen je MALDI TOF-om posle tripsinske digestije modifikata gde je pokazano da se jedan molekul hinona vezuje za jedan molekul lizozima preko lizina-97. Svim dobijenim modifikatima lizozima je određena enzimska aktivnost, a dobijeni rezultati su pokazali da je nakon modifikacije aktivnost enzima očuvana. Predstavljene su i objašnjeni rezultati aktivnosti modifikata lizozima i sintetisanog model jedinjenja peptidnog fragmenta 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama kao i toksičnost prema račićima *Artemia salina*. Avaronom i njegovim derivatima su modifikovani plazmidi pBR322 i pUC18 pri čemu je plazmid pUC18 modifikovan i u atmosferi azota. Dobijeni rezultati prikazani na agaroznim elektroforezama su detaljno objašnjeni i diskutovani. Avaronom i njegovim derivatima modifikovana je i DNA iz timusa teleata. Na snimljenim apsorpcionim i fluorescentnim spektrima modifikata DNA iz timusa teleata uočene su i diskutovane promene u odnosu na nemodifikovanu linearnu DNA.

Na osnovu svih dobijenih rezultata predložen je mehanizam biološkog dejstva avarona i njegovih derivata.

U okviru poglavlja **Eksperimentalni deo** kandidat daje detaljan opis aparata, reagenasa i eksperimentalnih procedura korišćenih u okviru doktorske disertacije.

U poglavlju **Zaključak** sumirani su dobijeni rezultati i predstavljen je njihov značaj u proučavanju mehanizma dejstva antitumorskih agenasa koji u svojoj strukturi imaju hinonsku farmakoforu.

Navedena **Literatura** (98 citata) obuhvata radove iz oblasti istraživanja i iscrpno pokriva sve delove disertacije.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Ova doktorska disertacija se sastoji iz tri dela. U prvom delu su prikazane sinteze i karakterizacija izabranih derivata avarona, kao i njihova biološka aktivnost prema gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama, aktivnost prema ćelijama raka, antioksidativna aktivnost i citotoksičnost prema račićima *Artemia salina*.

U drugom delu ove doktorske disertacije je opisana optimizacija uslova za modifikaciju lizozima avaronom i njegovim derivatima. Promene na samom enzimu su ispitivane biohemijskim metodama i primenom analitičkih instrumenata pri čemu je nedvosmisleno utvrđeno da je mesto vezivanja hinonskih jedinjenja za molekul lizozima Lys-97. Ispitana je i antibakterijska aktivnost dobijenih biokonjugata, koja je povećana i u odnosu na lizozim i u odnosu na hinone.

U trećem delu je opisana modifikacija cirkularne i linearne DNA avaronom i njegovim derivatima. Na osnovu svih dobijenih rezultata kandidat je predložio mehanizam kojim hinonska jedinjenja oštećuju molekule DNA.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Interakcije farmakološki aktivnih liganada sa proteinima i DNA predstavljaju jednu od vodećih problematika danas. Veliki broj lekova u upotrebi kao mehanizam delovanja imaju interakcije sa proteinima i DNA. Uporedo sa sintezom novih lekova, radi se i na sintezi modifikovanih proteina čije se farmakološko dejstvo ogleda u interakcijama protein–protein.

S obzirom na to da hinonska jedinjenja imaju dvostruki mehanizam biološkog dejstva, predmet proučavanja ove doktorske disertacije jeste mogućnost adicije ćelijskih nukleofila na hinonsko jezgro kao i uočavanje promena na biološkim molekulima nakon adicije. Pored naučnog doprinosa u proučavanju još uvek nedovoljno jasnog mehanizma dejstva hinonskih lekova, ova doktorska disertacija dala je i doprinos u kreiranju hinonskih biokonjugata. Novosintetisani biokonjugati mogu pokazivati sinergističko biološko dejstvo ili transportovati biološki aktivne molekule do određenih tkiva i organa.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

Kandidat ima ukupno 10 radova, a iz doktorske teze su proistekla 2 naučna rada.

Radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu (M₂₁)

1. Irena Novaković, Uroš Anđelković, Mario Zlatović, Miroslav J. Gašić and Dušan Sladić, Bioconjugate of lysozyme and the antibacterial marine sesquiterpene quinone avarone and its derivatives, *Bioconjugate Chemistry*, 2012, **23**, 57–65 (IF 5,002)
2. Tatjana Božić, Irena Novaković, Miroslav J. Gašić, Zorica Juranić, Tatjana Stanojković, Srđan Tufegdžić, Zoran Kljajić and Dušan Sladić, Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, **45**, 923–929 (IF 3,193)

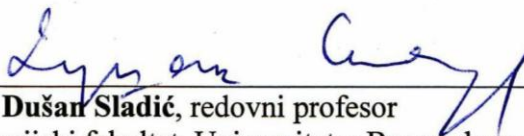
E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji pod naslovom **„Proučavanje interakcija biološki aktivnog hinona avarona i njegovih derivata sa lizozimom, linearnom i cirkularnom dezoksiribonukleinskom kiselinom“** kandidat, Irena Novaković, uspešno realizovala postavljene ciljeve doktorske disertacije.

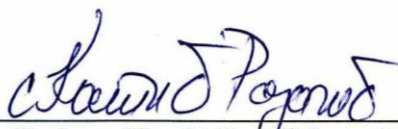
Beograd,

30. mart 2012. godine

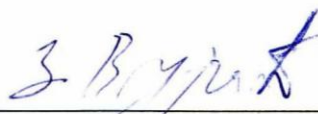
Komisija:



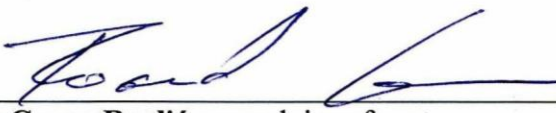
dr Dušan Sladić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, mentor



dr Slađana Kostić Rajačić, naučni savetnik
IHTM-Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu



dr Zoran Vujčić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu



dr Goran Roglić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prilog

Bibliografija radova

1. T. Božić, D. Sladić, M. Zlatović, I. Novaković, S. Trifunović, M.J. Gašić: Regioselectivity of conjugate additions to monoalkyl-1,4-benzoquinones, *J. Serb. Chem. Soc.* **67**, 547–551, **2002** (chem. mult. 89/119 if. 0,361)
2. I. Novaković, Z. Vujčić, T. Božić, N. Božić, N. Nilosavić, D. Sladić: Chemical modification of beta-lactoglobulin by quinones, *J. Serb. Chem. Soc.* **68**, 243–248, **2003** (chem. mult. 88/123 if. 0,474)
3. D. Sladić, I. Novaković, Z. Vujčić, T. Božić, N. Božić, D. Milić, B. Šolaja, M.J. Gašić: Protein covalent modification by biologically active quinones, *J. Serb. Chem. Soc.* **69**, 901–907, **2004** (chem. mult. 85/124 if. 0,522)
4. N. Milosavić, R. Prodanović, S. Jovanović, I. Novaković, Z. Vujčić: Preparation and characterization of two types of covalently immobilized amyloglucosidase, *J. Serb. Chem. Soc.* **70**, 713–719, **2005** (chem. mult. 99/124 if. 0,389)
5. K. Penov-Gaši, M. Đurendić-Brenesel, E. Đurendić, M. Sakač, J. Čanadi, J. Daljev, T. Armbruster, S. Andrić, D. Sladić, T. Božić, I. Novaković, Z. Juranić: Synthesis and biological evaluation of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androst-5-ene derivatives, *Steroids* **72**, 31–40, **2007** (biochem. mol. biol. 156/263 if. 2,143)
6. M. Tsoukatou, J.P. Maréchal, C. Hellio, I. Novaković, S. Tufegdžić, D. Sladić, M.J. Gašić, A.S. Clare, C. Vagias, V. Roussis: Evaluation of Activity of the Sponge Metabolites Avarol and Avarone and their Synthetic Derivatives Against Fouling Micro- and Macroorganisms, *Molecules*, **12**, 1022–1034, **2007** (chem. org. 39/56 if. 0,940)
7. I. Pajić, Z. Vujčić, M. Vujčić, I. Novaković, D. Sladić, M.J. Gašić: Chemical modification of the lectin of the marine coral *Gerardia savaglia* by marine quinone avarone, *J. Serb. Chem. Soc.* **72**, 1271–1274, **2007** (chem. mult. 95/127 if. 0,536)
8. N. Filipović, H. Borrmann, T. Todorović, M. Borna, V. Spasojević, D. Sladić, I. Novaković, K. Anđelković: Copper(II) complexes of N-heteroaromatic hydrazones: Synthesis, X-ray structure, magnetic behavior and antibacterial activity, *Inorg. Chim. Acta*, **362**, 1996–2000, **2009** (chem. inorg. nuc. 17/44 if. 2,322)
9. T. Božić, I. Novaković, M.J. Gašić, Z. Juranić, T. Stanojković, S. Tufegdžić, Z. Kljajić, D. Sladić: Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone, *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 923–929, **2010** (chem. med. 11/54 if. 3,193)
10. Irena Novaković, Uroš Anđelković, Mario Zlatović, Miroslav J. Gašić and Dušan Sladić, Bioconjugate of lysozyme and the antibacterial marine sesquiterpene quinone avarone and its derivatives, *Bioconjugate Chem.*, **23**, 57–65, **2012** (chem. org. 7/56 if. 5,002)