

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



РСЛУБЛІКА СРПСКА
УНІВЕРЗІТЕТ У БАЊА ЛУЦІ
Природно-математички факултет
Број: 19/4.509/22
Датум: 03.06.2022 100
БАЊА ЛУЦА

IZVJEŠTAJ
o ocjeni urađene doktorske disertacije

I PODACI O KOMISIJI

- 1) Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je na 210. sjednici održanoj 16. 05. 2022. godine donijelo Odluku broj 19/3.1137/22 kojom je imenovalo Komisiju za pregled, ocjenu i odbranu urađene doktorske disertacije. Komisija je dužna da u roku od 60 dana napiše Izvještaj o ocjeni urađene doktorske disertacije „Formiranje i inhibicija kompleksa amiloid beta peptida sa bakrom u uslovima oksidativnog stresa – mehanističke studije”, kandidata mr Seada Ljubijankića.
 - 2) Komisija:
 - Dr Svetlana Sredić, vanredni profesor, uža naučna oblast Neorganska hemija, Rudarski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **predsjednik**
 - Dr Semira Galijašević, redovni profesor, uža naučna oblast Medicinska hemija i biohemija, Sarajevo School of Science and Technology, Medical School u Sarajevu, **mentor-član**
 - Dr Biljana Davidović-Plavišić, vanredni profesor, uža naučna oblast Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **mentor-član**
 - Dr Milica Balaban, vanredni profesor, uža naučna oblast Organska hemija, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **član**
 - Dr Halid Makić, redovni profesor, uža naučna oblast Fizikalna hemija, Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću, **član**
 -
- 1) Navesti datum i organ koji je imenovao komisiju;
 2) Navesti sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, naučno-nastavnog zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje i naziva univerziteta/fakulteta/instituta na kojem je član komisije zaposlen.

II PODACI O KANDIDATU

- 1) Sead, Ramadan, Ljubijankić
 - 2) 26.09.1962. godine, Cazin, Bosna i Hercegovina
 - 3) Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za hemiju, magistar hemijskih nauka
 - 4) Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, „Spektrofotometrijsko određivanje konstanti vezivanja salicilideniminskih Ru(III) kompleksa sa DNA“, Hemijske nauke, 03.09.2014. godine
 - 5) Hemijske nauke
 - 6) Tema odobrena Odlukom Senata Univerziteta u Banjoj Luci broj 02/04-3.189- 51/17 od 23.02.2017.godine, *Studijski program hemija*
- 1) Ime, ime jednog roditelja, prezime;
 2) Datum rođenja, opština, država;

- 3) Naziv univerziteta i fakulteta i naziv studijskog programa akademskih studija II ciklusa, odnosno poslijediplomskih magistarskih studija i stečeno stručno/naučno zvanje;
 4) Fakultet, naziv magistarske teze, naučna oblast i datum odbrane magistarskog rada;
 5) Naučna oblast iz koje je stečeno naučno zvanje magistra nauka/akademsko zvanje mastera;
 6) Godina upisa na doktorske studije i naziv studijskog programa.

III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

1) „Formiranje i inhibicija kompleksa amiloid beta peptida sa bakrom u uslovima oksidativnog stresa – mehanističke studije”
 2) Tema odobrena Odlukom Senata Univerziteta u Banjoj Luci broj 02/04-3.189- 51/17 od 23.02.2017.godine
 3) Poglavlje „UVOD” je napisano na tri stranice (str. 1-3) i sadrži opis Alzhejmerove bolesti (AD) odnosno njeno povezivanje sa stvaranjem senilog plaka u mozgu, struktorno definisanog kao agregacija amiloid beta peptida ($A\beta$ peptid). Zbog štetnog djelovanja na biomolekule, u prvom redu na proteine, u patogenezi AD istaknuta je značajna uloga reaktivnih vrsta kisika (ROS) i oksidativnog stresa. Istraživanja su pokazala da su u amiloidnim nakupinama u povećanoj količini akumulirani redoks-aktivni ioni bakra koji se vežu za amiloid beta peptide koordiniranjem na atome aminokiselina, a kompleks Cu-A β se pokazao kao molekula koja je direktno povezana sa produkcijom slobodnih radikalova. Bakar kao esencijalni element u ljudskom organizmu nalazi se u malim količinama u različitim ćelijama i tkivima, a njegova raznovrsna uloga u živim organizmima vezana je za njegovu polivalentnost, kao i za sklonost njegovih iona da grade kompleksna jedinjina. Melatonin je hormon koji je jak antioksidans, a pored niza fizioloških osobina melatonin može formirati komplekse sa ionima bakra i na taj način inhibirati djelovanja iona bakra na formiranje A β nakupina. Iz tog razloga testiranje melatonina kao mogućeg prirodnog inhibitora može dovesti do zaključaka o vezi između strukture molekule i njene funkcije, te razvoju ciljanih inhibitora bakar-A β peptid kompleksa.

Kandidat je u poglavlju „PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA” (65 stranica; str. 4-69), jasno definisao Alzhajmerovu bolest sa patološkog i biohemiskog aspekta (str. 4-6), te detaljnu strukturu amiloid beta peptida, opisujući porodicu amiloid prekursor proteina, proteolitičku degradaciju APP695 izoforme te strukturu A β monomera (str. 7-14). Predstavljen je sveobuhvatan literarni pregled biometala, odnosno priroda interakcije metala i biomolekula kroz termodinamičke i kinetičke aspekte, te opisani kompleksi metala sa biomolekulama. (str. 15-31). Detaljno je opisan bakar kao biometal i homeostaza bakra (str. 32-37), kompleksi bakra sa biomolekulama sa posebnim akcentom na istraživanja sintetskih kompleksa bakra sa aminokiselinama i peptidima (str. 38 -54). Prikazana je definicija i biohemija melatonina, a zatim opisan melatonin kao inhibitor toksičnih efekata bakra (str. 55-67). Na kraju ovog poglavlja opisana je povezanost oksidativnog stresa i Alzheimerove bolesti (str. 68-69).

Poglavlje „MATERIJAL I METODE RADA” (9 stranica; str. 70-79) sadrži: navedene korištene hemikalije i reagense (str. 70), opis metode FTIR i UV Vis spektroskopije i metode određivanja antioksidativnog kapaciteta (str. 70-73), opisanu proceduru sinteze kompleksa bakra sa aminokiselinama i melatoninom (str. 74-78) i vezivanje Cu $^{2+}$ sa A β peptidom u prisustvu i prisustvu različitih koncentracija melatonina (str. 79).

Poglavlje „REZULTATI” (25 stranica; str. 80-105) sadrži pregled dobijenih rezultata predstavljenih u tabelama i grafički. Prvi odjeljak prikazuje pojedinačne i uporedne FTIR spektre aminokiselina odnosno melatonina i odgovarajućih Cu(II) kompleksa, izdvojene karakteristične vibracije prikazane u tabelama i kratak opis spektara (str. 80-93). U nastavku su prikazani UV Vis spektri aminokiselina i melatonina kao i sintetisanih Cu(II) kompleksa (str. 94-99), ukupni antioksidativni kapacitet kompleksa prikazan grafički i tabelarno (str. 100-101) te UV Vis spektri A β proteina sa različitim koncentracijama Cu(II) i melatonina (str. 102-105).

Poglavlje „DISKUSIJA“ (16 stranica; str. 106-122) sadrži detaljnu analizu dobijenih rezultata. Detaljno su opisane sve karakteristične trake u FTIR spektrima aminokiselina i melatonina, te odgovarajućih kompleksa, sa razlikama koje upućuju na koordinaciju Cu(II), što je prikazano odgovarajućim pretpostavljenim strukturama kompleksa (str. 106-119). Analiza UV Vis spektara aminokiselina, melatonina i odgovarajućih kompleksa opisana je na stranici 120, a rezultati

ispitivanja antioksidativnog kapaciteta na stranici 121. Rezultati UV Vis spektroskopske analize Cu²⁺ sa Aβ peptidom u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija melatonina, koji ukazuju da je Aβ agregacija i stvaranje kompleksa sa Cu(II) inhibirano u prisustvu melatonina, analizirani su na stranici 122.

Poglavlje „ZAKLJUČAK” (3 stranice; str. 123-125) sadrži pravilno i sistemski navedene zaključke ovog istraživanja, uz jasno navođenje njihovog teorijskog i praktičnog značaja za ispitivanu oblast. Poglavlje „LITERATURA” (16 stranica; str. 126-142) sadrži 161 abecedno navedenu referencu.

4) Disertacija sadrži 142 numerisane stranice računarski obrađenog teksta, 15 tabela i 88 slika. Citirana je 161 referenca. Na početku disertacije nalazi se 15 stranica koja nisu numerisane, a na kojima se nalazi naslov, rezime, sadržaj, te lista skraćenica. Disertacija obuhvata sedam poglavlja: Uvod, Pregled dosadašnjih istraživanja, Materijal i metode rada, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura.

- 1) Naslov doktorske disertacije;
- 2) Vrijeme i organ koji je prihvatio temu doktorske disertacije
- 3) Sadržaj doktorske disertacije sa straničenjem;
- 4) Istači osnovne podatke o doktorskoj disertaciji: obim, broj tabela, slika, šema, grafikona, broj citirane literature i navesti poglavlja.

IV UVOD I PREGLED LITERATURE

1) Stvaranje senilnog plaka u mozgu kod Alzheimerove bolesti, struktorno definisanog kao agregacija amiloid beta peptida, je proces koji nije u potpunosti istražen niti definisan. Iako postoji više teorija koje objašnjavaju formiranje ovog plaka, još nije jasan mehanizam njegovog nastajanja, niti postoje lijekovi za zaustavljanje ovog procesa ili inhibiciju agregacije. Očigledno je da postoje stukturne promjene proteinske strukture inicirane na samom početku razvoja bolesti, koje dalje rezultiraju formiranjem plaka i smanjenjem fizioloških funkcija. Istraživanja su pokazala da su u amiloidnim nakupinama plaka akumulirani redoks-aktivni ioni bakra vezani za amiloid beta peptide koordiniranjem na atome aminokiselina, a kompleks Cu-Aβ se pokazao kao molekula koja je direktno povezana sa produkcijom slobodnih radikala.

S obzirom da metabolički procesi koji uključuju bakar imaju mnoštvo metabolita i metaboličkih puteva korisno je bilo proučiti koordinacijsko ponašanje ovog biometala prema odabranim biomolekulama u kontrolisanim uslovima, pripremom i karakterizacijom odgovarajućih kompleksa. Najprostije biomolekule normalno prisutne u ćelijskoj citoplazmi odnosno sredini gdje se bakar metabolizira su aminokiseline, pa su stoga odabrane za ispitivanje ponašanja i koordinacijskih preferencija bakra u biološkim sistemima.

Inhibicija stvaranja Cu-Aβ kompleksa na molekularnom nivou nije detaljno proučavana, mada bi mogući inhibitori mogli da učestvuju u smanjivanju ili potpunom inhibiranju koordinacije i na taj način zaustave proces formiranja patoloških nakupina, a ispitivanje uticaja melatonina kao mogućeg prirodnog inhibitora može dovesti do zaključaka o vezi između strukture molekule i njene funkcije, te razvoju ciljnih inhibitora bakar-Aβ peptid kompleksa. Melatonin, hormon koji proizvodi pinealna žlijezda pored niza fizioloških uloga poznat je kao jak antioksidans. Osim toga melatonin može formirati kompleks sa ionima metala, naročito bakrom i na taj način inhibirati djelovanja bakarnih iona na formiranje Aβ nakupina. Ovo istraživanje je bilo fokusirano na molekularni aspekt procesa koji u fazi inicijacije može biti kontrolisan prisustvom iona metala kao što je bakar, a naročito u prisustvu slobodnih radikala. Osim toga, inhibicija ovog procesa predloženom molekulom, melatoninom, može dati rezultate na kojima bi se mogla bazirati dalja farmakološka ispitivanja.

2) Alzhajmerova bolest (AD) danas pogađa ogroman broj ljudi u svijetu, uz stalno povećanje broja oboljelih. Očigledno je da postoje stukturne promjene proteinske strukture inicirane na samom početku razvoja bolesti, koje dalje rezultiraju formiranjem plaka i smanjenjem fizioloških funkcija. Širokim spektrom istraživanja sa različitim aspekata, pokušavano je doći do objašnjenja za promjene proteinske strukture u toku razvoja bolesti ali je i dalje nepoznat sam početak ovog procesa. Glavna komponenta amiloidnih plakova, kao jednog od dva tipična histopatološka nalaza u moždanom tkivu AD bolesnika, jeste akumulirani amiloid β peptid. Amiloid prekursor protein (APP) koji ima značajnu, ali ne sasvim objašnjenu funkciju u održavanju neuronalne homeostaze, smatra se

kontraverznim peptidom. APP porodicu proteina čine integrirani membranski proteini izraženi u mnogim tkivima, posebno u neuronalnim sinapsama. APP se sastoji od jedne transmembranske domene sa dugom ekstracelularnom, glikoziliranom N-terminalom te kraće citoplazmatske C-terminale (Kang i saradnici, 1987). Brojni su radovi koji ukazuju na značajnu ulogu reaktivnih vrsta kisika (ROS) i oksidativnog stresa u patogenezi AD, upravo zbog štetnog djelovanja na biomolekule, u prvom redu na proteine (Singh i saradnici, 2019). Važno je uzeti u obzir i činjenicu da su neuroni naročito osjetljivi na oksidativni stres zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama, što pogoduje nastanku lipidne peroksidacije. Pored toga za mozak je karakteristična i veća potrošnja kisika, slabija antioksidativna odbrana (Rego i Oliveira, 2003), a redoks aktivni metali (bakar i željezo) prisutni u mozgu, aktivno učestvuju u formirajući ROS (Berg i saradnici, 2004; McQuillen i Ferriero, 2004). Iako je patogeneza neurodegenerativnih oboljenja još uvek nedovoljno razjašnjena i vrlo kompleksna, postojeća istraživanja ukazuju na kritičnu ulogu ROS budući da je oksidativni stres prateća pojava u mozgu pacijenata sa Alzheimerovom, Parkinsonovom i drugim neurodegenerativnim bolestima (Albers i Beal, 2000; Dias i saradnici, 2013).

Najčešći izolovani agregati amiloid beta peptida su A β (1-40) i A β (1-42) sa 40 i 42 aminokiseline u strukturi. Strukturno gledano, ovaj niz aminokiselina sa svojim hidrofilnim i hidrofobnim ostacima, te sa amino i karboksilnim grupama u strukturi, vrlo jednostavno može da gradi komplekse sa različitim metalima kao što su bakar i cink. Bakar kao esencijalni element u ljudskom organizmu nalazi se u malim količinama (75-150 mg) u različitim ćelijama i tkivima, sa najvećom koncentracijom u jetri, bubrezima, slezeni, srcu, plućima, želucu, kosi i noktima (Lutsenko, 2010). Raznovrsna uloga ovog biometala u živim organizmima vezana je za njegovu polivalentnost, kao i za sklonost njegovih iona da grade kompleksna jedinjenja. Kako se već davno pokazalo da je poremećaj u metabolizmu bakra vezan i za mnoga neurološka stanja kao što je to slučaj u Wilsonovoj bolesti, razumijevanje homeostaze bakra na molekularnom nivou ukazalo je na do tada neviđen značaj ovog elementa u održavanju normalnih životnih procesa, ali i na značaj narušavanja ovih procesa u pogoršavanju patogeneze drugih oboljenja (Ala i saradnici, 2007).

Cu(I) ion se dobro vezuje sa ligandima preko -SH grupa i N-atoma imidazolskog prstena histidina iz proteina (Scheiber i saradnici, 2013). Cu(II) ion ima veliki afinitet prema kvadratno-planarnoj koordinaciji Cu-N sa azotom iz NH₂ grupe aminokiselina, proteina, ribonukleinskih kiselina (RNK) i dezoksiribonukleinskih kiselina (DNK). Kao aktivni centar bakar se nalazi u enzimima za transport elektrona (azurin, plastocijanin), enzimima koji učestvuju u procesima oksidacije (tirozinaza, askorbat oksidaza, fenolaza) i enzimima za transport kisika (hemocijanin) (Messerschmidt, 2010). Potencijalno vezivanje bakra u jednom od njegova dva oksidaciona stanja zavisi kako od svih nivoa strukture proteina sa kojima on interaguje tako i od fizičko-hemijskih karakteristika celularne sredine u kojoj se interakcija odvija te produkt nastaje (Dos Santos Carvalho i Fernandes, 2019). U enzimskim sistemima bakar može biti prisutan u deformisanoj tetraedarskoj koordinaciji preko N- i S-donorskih atoma biomolekula, u trigonalno bipiramidalnoj koordinaciji i kao binuklearni centar Cu(II) iona sa koordinacionim brojem 5 i kisikom kao most ligandom. Mnoge studije su pokušale da utvrde način vezivanja metala na peptid koristeći kraće petidne forme ili tzv. mimetičke komplekse (Ma i saradnici, 2006). Takođe, ispitivana je stehiometrija formiranja kompleksa, gdje je zaključeno da se i kod veoma niskih koncentracija bakarnih iona stvaraju kompleksi stehiometrijskog odnosa 1:1. Izmjene u metabolizmu bakra mogu dovesti do njegove akumulacije u određenim regionima organizma ili izmijeniti njegovu bioraspoloživost u celularnoj sredini. Obje mogućnosti asocirane sa povećanim oksidativnim stresom odnosno stvaranjem ROS-a dakako uslijed dobro poznatog redoks ponašanja bakra koji organizam značajno iskoristiava pri homeostatskim uslovima (Waggoner i saradnici, 1999). U ranijim fazama izučavanja etiologije Alzheimerove bolesti povlačile su se izvjesne paralele između akumulacije aluminija u moždanom tkivu i pojave AD. Ova hipoteza je fundamentalno napuštena zbog nedostatka zadovoljavajućih dokaza koji bi dali efektivnu konekciju između ova dva faktora (Lidsky, 2014). Ipak, ovakve hipoteze podstakle su izučavanje uloge melatonina i njegovih metabolita/prekursora kao potencijalnih helatora toksičnih metala u moždanom tkivu s obzirom na opsežan diapazon fizioloških aktivnosti koje pokazuju. Limson, Nyokong, i Daya (1998) su stoga ispitivali mogućnost *in situ* stvaranja kompleksnih vrsta između triptofana, serotonina te melatonina sa odabranim biogenim i abiogenim metalima u vodenom rastvoru (ili acetonitrilnom rastvoru) koristeći

adsorptivnu *stripping* voltometriju uz zaključak da melatonin, u ovim eksperimentalnim uslovima, gradi komplekse sa Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} te Fe^{3+} ali ne sa Fe^{2+} . Pomenuta studija implicira da je kompleks nastao između melatonina i Cd^{2+} znatno stabilniji zbog negativnog pomjeranja redupcionog potencijala koji izostaje u toj amplitudi kod kompleksnih vrsta nastalih sa Cu^{2+} , Zn^{2+} te Pb^{2+} i melatoninom. S obzirom da u ovoj studiji nije bilo pokušaja izolacije i karakterizacije kompleksnih vrsta, bilo je adekvatno sprovesti teoretske studije modeliranja koordinacijskog ponašanja kako melatonina tako i njegovih metabolita. Istraživačka grupa na čelu sa Galanom (2014.) napravila je opsežne DTF teoretske kalkulacije stabilnosti, koordinacijskih modova i termohemijskih karakteristika melatonina i njegovih metabolita sa $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ i $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ ionima kao reprezentativnim „slobodnim bakrom“ u živim ćelijama.

Kako vezani bakar degradacijom APP-a završava u ekstracelularnom prostoru izlučivanjem sa dentritične plazma membrane i iz tijela akosna (Waggoner i saradnici 1999) to može kompromitirati normalan transport bakra u ćeliju u moždanoj homeostazi Cu. Vezani Cu(I) lako se oksidira vodik peroksidom natrag u Cu(II) što je popraćeno kidanjem APP-a, uz nastanak više peptida uključujući N-terminalni amiloida β. Sve navedeno upućuje na ulogu bakra u stimulaciji ekstraneuronalne agregacije amiloida β kao i porasta oksidativnog stresa, što može objasniti razvoj simptoma AD-a u poznjoj dobi ili sporiju progresiju kod mlađih osoba s obzirom na viši nivo antioksidativnih supstanci u moždanom tkivu (Multhaup i saradnici, 1998). Ispitivanje efekta melatonina kao potencijalnog inhibitora stvaranja kompleksnih vrsta sa proteinima koji bi pogoršali simptomatologiju AD-a, postalo je interesantno posebno imajući u vidu afinitet melatonina za destruktivni *skevindžer* radikal te posljedično nastajanje metabolita dobre helatačiske moći za Cu (Galano i saradnici, 2014) *skevindžer*-kaskadom melatonina. Studije izvdene *in vitro* na hepatocitima pacova jasno su ukazale na vezu u porastu koncentracija bakra i hepatocelularne smrti izazvane, između ostalog, lipidnom peroksidacijom i narušavanjem integriteta plazma membrane hepatocita (Haywood i Loughran, 2008). S druge strane, lipidna peroksidacija hepatocita izloženih bakru je značajno smanjena u prisustvu melatonina, najvjerojatnije *skevindžer* aktivnošću melatonina (Parmar i saradnici, 2002). 1)

Literatura citirana u doktorskoj disertaciji, a navedena u ovom dijelu izvještaja: Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., ... Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106): 733–736; Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., i Kukreti, S. (2019) Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583; Rego, A. C., i Oliveira, C. R. (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemical research*, 28(10), 1563-1574; Berg, D., Youdim, M. B., i Riederer, P. (2004) Redox imbalance. *Cell and tissue research*, 318(1), 201-213; McQuillen, P. S., i Ferriero, D. M. (2004) Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatric neurology*, 30(4), 227-235; Albers, D. S., i Beal, M. F. (2000) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *Advances in Dementia Research*, 133-154.; Dias, V., Junn, E., Mouradian, M. M. (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461-491.; Lutsenko, S. (2010) Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2): 211–217; Ala, A., Walker, A. P., Ashkan, K., Dooley, J. S., Schilsky, M. L. (2007) Wilson's disease. *The Lancet*, 369(9559): 397–408.; Scheiber, I., Dringen, R., Mercer, J. F. B. (2013) Copper: Effects of Deficiency and Overload. In: Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases, Dordrecht: Springer Netherlands; Messerschmidt, A. (2010) Copper Metalloenzymes. *Comprehensive Natural Products II*, 8: 489–545.; Dos Santos Carvalho, C., Fernandes, M. N. (2019) Effects of copper toxicity at different pH and temperatures on the *in vitro* enzyme activity in blood and liver of fish, Prochilodus lineatus. *Molecular Biology Reports*, 46(5): 4933–4942.; Ma, Q. F., Hu, J., Wu, W. H., Liu, H. D., Du, J. T., Fu, Y., Wu, Y. W., Lei, P., Zhao, Y. F., Li, Y. M. (2006) Characterization of copper binding to the peptide amyloid-β(1–16) associated with Alzheimer's disease. *Biopolymers*, 83(1): 20–31.; Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B., Gitlin, J. D. (1999) The Role of Copper in Neurodegenerative Disease. *Neurobiology of Disease*, 6(4): 221–230.; Lidsky, T. I. (2014) Is the Aluminum Hypothesis Dead? *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 56: S73–S79.; Limson, J., Nyokong, T., Daya, S. (1998) The interaction

of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: An adsorptive voltammetric study. *Journal of Pineal Research*, 24(1): 15–21.; Galano, A., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2014) Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxy radical scavenging activity of melatonin. *RSC Advances*, 4(10): 5220.; Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Bill, E., Pipkorn, R., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1998) Copper-Binding Amyloid Precursor Protein Undergoes a Site-Specific Fragmentation in the Reduction of Hydrogen Peroxide. *Biochemistry*, 37(20): 7224–7230.; Haywood, S., Loughran, M. (2008) Copper toxicosis and tolerance in the rat. II. Tolerance - a liver protective adaptation. *Liver*, 5(5): 267–275.; Parmar, P., Limson, J., Nyokong, T., Daya, S. (2002) Melatonin protects against copper-mediated free radical damage. *Journal of Pineal Research*, 32(4): 237–242.

- 3) Ovo istraživanje je bilo fokusirano na molekularni aspekt procesa koji u fazi inicijacije može biti kontrolisan prisustvom iona bakra u prisustvu slobodnih radikala. Ispitivana je inhibicija procesa nastajanja A β peptid kompleksa melatoninom, a ova ispitivanja generalno daju rezultate na kojima bi se mogla bazirati dalja farmakološka ispitivanja.
- 4) Očekivani naučni doprinos ove disertacije se odnosi na rezultate koji ukazuju na koordinaciono ponašanje Cu(II) sa biomolekulama, te potvrđuju inhibitorno djelovanje melatonina na procese stvaranja kompleksa koji uzrokuju proteinske promjene i stvaranje amiloidnog plaka u razvoju Alzheimerove bolesti.

- 1) Ukratko istaći razlog zbog kojih su istraživanja preduzeta i predstaviti problem, predmet, ciljeve i hipoteze;
- 2) Na osnovu pregleda literature sažeto prikazati rezultate prethodnih istraživanja u vezi problema koji je istraživan (voditi računa da obuhvata najnovija i najznačajnija saznanja iz te oblasti kod nas i u svijetu);
- 3) Navesti doprinos teze u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja;
- 4) Navesti očekivane naučne i pragmatične doprinose disertacije.

V MATERIJAL I METODE RADA

- 1) U cilju ispitivanja koordinacijskog ponašanja bakra prema odabranim biomolekulama u kontrolisanim uslovima, sintetisani su Cu(II) kompleksi sa alaninom, glicinom, histidinom, triptofanom i melatoninom kao ligandima. Svi Cu(II) kompleksi pripremljeni su u metanolnim rastvorima reakcijom odgovarajućih aminokiselina i melatonina sa bezvodnim bakar(II) hloridom. Bakar(II)hlorid izabran je kao so bakra sa biogenim anionom (Cl $^-$) prisutnim u citoplazmi svih neurona u kojima se i očekuje stvaranje ovih kompleksa. Reakcioni uslovi prvenstveno u smislu odabira rastvarača podešeni su tako da se izbjegne stvaranje kopleksa predvidive strukture, već opisanih u literaturi, a koji su bez biohemijskog značaja.
 - 2) Kompleksi su ispitani FTIR spektroskopijom. Spektri su snimljeni metodom KBr pastile u spektralnom rasponu od 4000 do 400 cm $^{-1}$ te nakonadno normalizirani, čime je utvrđeno da odabrani reakcioni uslovi rezultiraju nastankom kompleksa složenije građe od prethodno u literaturi opisanih kompleksa Cu(II) sa istim ligandima. Spektri kompleksa bakra sa aminokiselinama i melatoninom pokazali su tipične trake u niskom području koje se pripisuju metal-ligand vibracijama i od velikog su značaja za utvrđivanje koordinacijskog tipa i potencijalne geometrije kompleksa. Kako je kao polazna supstanca bakra korišten bakar(II) hlorid nije isključeno zadržavanje hlorida u koordinacionoj sferi u konačnom kompleksu.
- UV-Vis spektri aminokiselina, melatonina i odgovarajućih kompleksa bakra snimljeni su kao DMSO rastvori u spektralnom području od 250 do 700 nm. Kako je vršena kvalitativna komparacija snimljenih spektara, iste nije bilo potrebno statistički dorađivati. Svi pet kompleksa pokazuju oštar maksimum u UV području koji su značajno intenzivniji od maksimuma u spektrima slobodnih aminokiselina.
- Antioksidativna aktivnost sintetisanih jedinjenja, određena upotrebom portabilnog uređaja e-BQC lab, pokazala je vrijednosti u rasponu CEAC od 121,6 - 734,4 μ M.
- Snimljeni su UV-Vis spektri A β proteina sa različitim koncentracijama Cu(II) i melatonina. UV-Vis spektri rastvora A β peptida inkubiranog sa melatoninom, titriranog sa Cu(II), pokazali su formiranje nove strukture sa pikovima na 330 nm i 360 nm. Pored izotermalne titracijske kalorimetrije, UV-Vis spektrofotometrija je uobičajena tehnika za praćenje interakcije ciljanih tvari

sa biomolekulama u vodenim rastvorima, naročito primjenljiva u slučajevima kada u interakciji nastupa elektronska promjena jednog od reaktanata (npr. stvaranje koordinacione veze) kao što je slučaj sa Cu(II) - A β peptida reakcijom.

- 1) Objasniti materijal koji je obradivan, kriterijume koji su uzeti u obzir za izbor materijala;
- 2) Dati kratak uvid u primjenjeni metod istraživanja pri čemu je važno ocijeniti sljedeće:
 1. Da li su primjenjene metode istraživanja adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća na tom polju u svjetskim nivoima;
 2. Da li je došlo do promjene u odnosu na plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske teze, ako jeste zašto;
 3. Da li ispitivani parametri daju dovoljno elemenata ili je trebalo ispitivati još neke, za pouzdano istraživanje;
 4. Da li je statistička obrada podataka adekvatna.

VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

U cilju određivanja reakcijskog mehanizma za stvaranje Cu(II)-A β kompleksa, u ovom radu ispitivan je način koordinacije Cu(II) na aminokiseline kao i djelovanje melatonina kao mogućeg inhibitora u stvaranju ovih kompleksa.

Cu(II) kompleksi sa alaninom, glicinom, histidinom, triptofanom i melatoninom kao ligandima pripremljeni su u metanolnim rastvorima reakcijom odgovarajućih aminokiselina i melatonina sa bezvodnim bakar(II) hloridom, ispitani su FTIR spektroskopijom. Spektri kompleksa bakra sa aminokiselinama i melatoninom pokazali su tipične trake u niskom području koje se pripisuju metal-ligand vibracijama i od velikog su značaja za utvrđivanje koordinacijskog tipa i potencijalne geometrije kompleksa. Kako je kao polazna supstanca bakra korišten bakar(II) hlorid nije isključeno zadržavanje hlorida u koordinacionoj sferi u konačnom kompleksu.

Pomjeranja tipičnih vibracija aminokiselina i melatonina ukazuju vid koordinacije na Cu(II) centar, a ukidanje pojedinih tipičnih traka ukazuju da vibracijski modovi više nisu mogući po uspostavljanju koordinacije ili pak dolazi do ukidanja degeneriranih vibracijskih modova.

Spektralno uočljiva promjena koju trpi koordinirana karboksilna grupa je pojava trake koja odgовара C=O vezi kao i trake koja odgовара C–O vezi, što ukazuje na ukidanje rezonancije u nekoordiniranoj karboksilnoj grupi, odnosno njeno učešće u koordinaciji.

Dodatna promjena u odnosu na spektre slobodnih liganada često je deprotoniranje amino grupe uslijed njene koordinacije, što se uočava ukidanjem traka tipičnih za –NH₃⁺ grupu i pojavom traka tipičnih za –NH₂ grupu.

Skeletne vibracije ne trpe značajna pomjeranja ili se pak njihove trake ukidaju ako određeni vibracijski mod postane nemoguć nakon koordinacije na metalni centar, što takođe predstavlja značajan podatak.

FTIR spektroskopijom je utvrđeno da odabrani reakcionali uslovi rezultiraju nastankom kompleksa složenije građe od prethodno u literaturi opisanih kompleksa Cu(II) sa istim ligandima.

UV-Vis spektri svih pet sintetisanih kompleksa pokazuju oštре maksimume u UV području, a koji su značajno intenzivniji od maksimuma u spektrima odgovarajućih slobodnih aminokiselina. UV-Vis spektri kompleksa sa histidinom, alaninom i glicinom pokazuju dodatnu apsorpciju niskog ekstinkcionog koeficijenta na oko 650 nm dok je ova apsorpcija u spektrima kompleksa sa melatoninom i triptofanom uočena na oko 503 nm. UV područje Cu-melatonin i Cu- triptofan kompleksa pored navedenih maksimuma, pokazuje i rame na 308 i 295 nm, respektivno.

Antioksidativna aktivnost sintetisanih jedinjenja , pokazala je vrijednosti u rasponu CEAC od 121,6 - 734,4 μ M. Najniže vrijednosti antioksidativnog kapaciteta utvrđene su za kompleks bakra s triptofanom, dok su najveće vrijednosti zabilježene za kompleks bakra s alaninom. Visok antioksidativni kapacitet utvrđen je za kompleks bakra s melatoninom (673,8 μ M).

Snimljeni su UV-Vis spektri A β proteina sa različitim koncentracijama Cu(II) i melatonina.

UV-Vis spektri rastvora A β peptida inkubiranog sa melatoninom, titriranog sa Cu(II), pokazali su fromiranje nove strukture sa pikovima na 330 nm i 360 nm. Povećanje koncentracije Cu(II) je izazvalo nestajanje pika na 330 nm, dok je pik na 360 nm rastao, ali sa manjim intenzitetom. Ove promjene ukazuju preuređivanje inicijalno formirane A β -Cu(II)-melatonin strukture, koja je zavisna

od koncentracija Cu(II). Uobičajeno jedna traka nižeg intenziteta (u području od 250 do 360 nm), bez velike apsorpcije na kraćim talasnim dužinama, obično pokazuje $n \rightarrow \pi^*$ prelaz i odnosi se na konjugovani hromofor koji generalno sadrži atome O, N ili S.

Rezultati ukazuju da je A β agregacija i stvaranje kompleksa sa Cu(II) inhibirano u prisustvu melatonina, ali u zavisnosti od koncentracija Cu(II) i melatonina.

Formiranje novih pikova koji nisu karakteristični ni za Cu(II) melatonin kompleks, niti za Cu(II)-A β formu, potvrđuje da dolazi do interakcije i formiranja strukture A β -Cu(II)-melatonin.

Tačnu strukturu forme A β -Cu(II)-melatonin forme nije moguće odrediti na osnovu dobijenih podataka.

2) Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni i poređeni sa rezultatima drugih autora.

3) Doprinos ovog istraživanja se ogleda u činjenici da na molekularnom nivou, fiziološke molekule su direktno uvezane u mehanizam djelovanja na strukturu proteina, te disbalans u ravnoteži metabolizma molekula mogu direktno uticati na strukturu proteina. Kao rezultat, potrebna su dalja istraživanja koja mogu omogućiti detaljnije poznavanje mehanizama ovih reakcija kao i same strukture mogućih kompleksa A β proteina sa biološkim molekulama. Originalnost doktorske disertacije provjerena je programom za plagijatorstvo sa indeksom sličnosti od 1%. Takođe, kandidat je iz oblasti teme doktorata publikovao dva rada:

1. Ljubijankić, S., Galijaševic, S., Plavšić-Davidović, B., Balaban, M., Ljubijankić, N. (2022) Synthesis, IR characterization and antioxidant capacity of Cu(II) complexes with amino acids and melatonin. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina.

2. Ljubijankić, N., Begić, S., Ljubović-Dedeić, A., Stanković, M., Salimović-Bešić, I., Jadranin, M., Bencun, B. and Ljubijankić, S. (2018) Antimicrobial and genotoxic activity of novel ruthenium(III) complex with N-phenyl-5-nitrosalicylideneimine. Rasayan J. Chem.,11(4): 1511-1518. DOI: 10.31788/RJC.2018.1145021.

1) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;

2) Ocijeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnost;

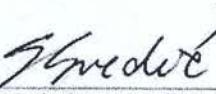
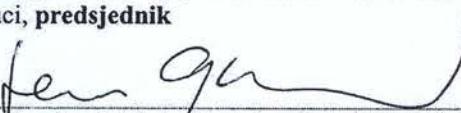
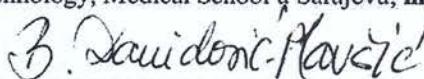
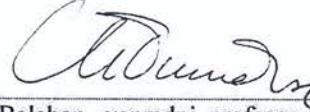
3) Posebno je važno istaći do kojih novih saznanja se došlo u istraživanju, koji je njihov teorijski i praktični doprinos, kao i koji novi istraživački zadaci se na osnovu njih mogu utvrditi ili nazirati.

VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

- 1) Doktorska disertacija mr Seada Ljubijankića pod nazivom „Formiranje i inhibicija kompleksa amiloid beta peptida sa bakrom u uslovima oksidativnog stresa – mehanističke studije” urađena je prema pravilima naučnoistraživačkog rada i rezultat je originalnog naučnog rada kandidata. Pored toga, kandidat je precizno i logički analizirao predloženu temu istraživanja i podatke doveo u vezu sa postavljenom hipotezom. Dobijeni rezultati jasno su ukazali da melatonin formira kompleks sa A_β-Cu(II), što ga jasno kandiduje za intenzivna dalja istraživanja u svojstvu inhibitora oksidativnog stresa u neuronima.
- 2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije Komisija predlaže Nastavno-naučnom vijeću da doktorsku disertaciju pod nazivom „Formiranje i inhibicija kompleksa amiloid beta peptida sa bakrom u uslovima oksidativnog stresa – mehanističke studije” prihvati, i da kandidatu mr Seadu Ljubijankiću odobri odbranu.
- 1) Navesti najznačajnije činjenice što tezi daje naučnu vrijednost, ako iste postoje dati pozitivnu vrijednost samoj tezi;
- 2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije komisija predlaže:
- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana,
 - da se doktorska disertacija vraća kandidatu na doradu (da se dopuni ili izmijeni) ili
 - da se doktorska disertacija odbija.

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

Datum: maj 2022. godine

1. 
Dr Svetlana Sredić, vanredni profesor, uža naučna oblast Neorganska hemija, Rudarski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **predsjednik**
2. 
Dr Semira Galijašević, redovni profesor, uža naučna oblast Medicinska hemija i biohemija, Sarajevo School of Science and Technology, Medical School u Sarajevu, **mentor-član**
3. 
Dr Biljana Davidović-Plavšić, vanredni profesor, uža naučna oblast Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **mentor-član**
4. 
Dr Milica Balaban, vanredni profesor, uža naučna oblast Organska hemija, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **član**
5. 
Dr Halid Makić, redovni profesor, uža naučna oblast Fizikalna hemija, Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću, **član**

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razlog zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.