

## ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Синтеза и антитуморски потенцијал C19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона кандидата  
Иване Кузминац

<p><b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b></p> <p><b>1. Датум и орган који је именовao комисију</b> Комисију именовало Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, на својој 45. седници, одржаној 05. јула 2018. године.</p> <p><b>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• др Мирјана Попсавин, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, датум избора у звање: 01.01.2003., Природно-математички факултет, Нови Сад, председник</li> <li>• др Марија Сакач, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, датум избора у звање 08.11.2007., Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор</li> <li>• др Едвард Петри, доцент, ужа научна област: Биохемија, датум избора у звање: 15.07.2013., Природно-математички факултет, Нови Сад, члан</li> <li>• др Андреа Николић, доцент, ужа научна област: Органска хемија, датум избора у звање 15.04.2015., Природно-математички факултет, Нови Сад, члан</li> <li>• др Димитар Јакимов, научни сарадник, ужа научна област: Биохемија, датум избора у звање: 28.03.2018., Институт за онкологију Војводине, Медицински факултет, Нови Сад, члан</li> </ul>
<p><b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b></p> <p><b>1. Име, име једног родитеља, презиме:</b> Ивана, Златко, Кузминац</p> <p><b>2. Датум рођења, општина, држава:</b> 26.07.1989., Сремска Митровица, Република Србија</p> <p><b>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</b> Природно-математички факултет, Нови Сад, мастер академске студије хемије - мастер органске хемије, 2013.</p> <p><b>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</b> 2013., Докторске академске студије хемије</p> <p><b>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:</b></p> <p><b>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:</b></p>
<p><b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Синтеза и антитуморски потенцијал C19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона</p>

#### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација „Синтеза и антитуморски потенцијал С19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона“ је написана на 276 страна на српском језику, латиничним писмом и садржи 10 поглавља: Увод (2 стране), Општи део (40 страна), Резултати и дискусија (82 стране), Експериментални део (44 стране), Закључак (6 страна), Summary (6 страна), Скраћенице (2 стране), Литература (14 страна), Прилог (98 страна) и Биографија (2 стране). Садржи: Слика: 191 (од тога 147 слика у Прилогу), Табела: 16, Схема: 49, Референци: 329.

#### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **Уводном** делу дисертације дат је кратак осврт везан за појам канцера – узрочници, фактори ризика, распрострањеност, морталитет, са посебним акцентом на канцер дојке. Изнете су чињенице везане за могућности лечења канцера дојке, нарочито код хормон зависних облика, као и у ком правцу су усмерена данашња истраживања. На основу наведених чињеница дефинисани су циљеви истраживања који су подразумевали синтезу нових С19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона. Поред тога важан циљ је био и испитивање антитуморског потенцијала одабраних новосинтетисаних једињења. Циљеви и значај истраживања су наведени јасно и прецизно.

У **Општем** делу дат је детаљан преглед литературе која се односи на канцер дојке, његове факторе ризика, симптоме и терапију. Описан је ензим ароматаза и његови инхибитори, као и хумани ензими алдо-кето редуктазе и њихова медицинска примена. Такође је дат детаљан преглед литературе везане како за синтезу и биолошку активност С19-дериватизованих стероида, тако и за њихово налажење у природи. Комисија констатује да је приказани литературни преглед свеобухватан и јасно презентован.

Поглавље **Резултати и дискусија** је подељен на два потпоглавља: **Синтеза и Антитуморски потенцијал синтетисаних једињења**. У делу Синтеза детаљно су приказани и дискутовани резултати који се односе на синтезу С19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона и њихових прекурсора, 5,6-дисупституисаних и 6,19-епокси деривата. Ови резултати су приказани у оквиру следећих наслова:

- Синтеза полазног стероидног D-хомо лактона
- Синтеза 5,6-дисупституисаних стероидних D-хомо лактона
  - Синтеза 5,6-халохидрина
  - Синтеза 3,5,6-трисупституисаних кисеоничних деривата
- Синтеза 6,19-епокси стероидних D-хомо лактона
- Синтеза 19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона

Резултати испитивања антитуморског потенцијала су приказани и продискутовани у оквиру следећих наслова:

- Биорасположивост синтетисаних једињења
- Испитивање антипролиферативне активности синтетисаних једињења
- Корелација између антипролиферативне активности и структуре синтетисаних једињења
- Виртуелни скрининг одабраних новосинтетисаних стероидних деривата
- Испитивање везивања синтетисаних једињења за стероидне рецепторе
- Испитивање инхибиторне активности одабраних новосинтетисаних једињења на одабрани ензим стероидогенезе

Резултати истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом су нови и оригинални, а проблематика је интересантна и актуелна.

У **Експерименталном** делу рада су детаљно описани поступци добијања свих синтетисаних једињења, као и њихова структурна карактеризација (асигнације NMR, IR и M-спектра). Експериментални поступци су приказани јасно и са довољно детаља да омогуће њихово понављање. Сва синтетисана једињења су окарактерисана савременим спектроскопским методама чиме је дефинитивно потврђен њихов идентитет и чистоћа.

У поглављу **Закључак** су јасно, прегледно и сажето изведени закључци из резултата приказаних у поглављу Резултати и дискусија, а одговарајући закључци на енглеском језику су приказани у поглављу **Summary**.

У одељку **Литература** су приказани литературни цитати, који су коришћени за писање „Увода“,

„Општег дела“ и поглавља „Резултати и дискусија“. Све референце су наведене прецизно и прегледно.

**Прилог** садржи слике IR и NMR спектара синтетизованих једињења што доприноси лакшем праћењу дела текста у одељку “Резултати и дискусија”, који се односи на тумачење спектроскопских доказа структуре синтетизованих једињења. Такође садржи извештаје добијене виртуелним скринингом одабраних једињења помоћу програма SwissTargetPrediction.

## **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

1. **Ivana Kuzminac**, Olivera Klisurić, Dušan Škorić, Dimitar Jakimov, Marija Sakač, Structural analysis and antitumor potential of novel 5,6-disubstituted-17 $\alpha$ -homo-17-oxa-androstane derivatives, Structural Chemistry (2017) 28:567–576. DOI 10.1007/s11224-016-0815-9, **M22** (5)

## **VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

У овом раду остварене су синтезе C19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона. Такође, синтетисани су и 5,6-халогени деривати, 5,6-супституисани кисеонични деривати, као и 6,19-епокси стероиди. За сва новосинтетисана једињења је утврђен антитуморски потенцијал испитивањем њихове оралне биорасположивости, антипролиферативне активности на одабране ћелијске линије хуманих канцера, способности везивања за релевантне стероидне рецепторе и инхибиторне активности на ензим AKR1C3.

Прекурсор у синтези свих новосинтетисаних једињења је био 3 $\beta$ -ацетокси-17-окса-17 $\alpha$ -хомоандрост-5-ен-16-он (**5**), који је добијен из дехидроепиандростерона (**1**) у четири синтетске фазе. Из лактона **5** су добијени 5,6-дисупституисани халогени деривати. Бромхидрин **6** и хлорхидрин **12** су добијени адицијом одговарајуће *in situ* генерисане хипохалогенесте киселине на двоструку везу једињења **5**. Принос бромхидрина **6** и број производа у овој реакцији јако варирају у зависности од примењених реакционих услова. Највећи принос и број производа се добијају када се реакција изводи са *N*-бромацетамидом, уз додаток 0,28 M HClO<sub>4</sub>, у диоксану, на собној температури, дневној светлости и у току 40 минута. При наведеним реакционим условима, поред бромхидрина **6** (67%) добијају се и 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -епоксид **7** (23%), 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -дибромид **8** (1,4%), 6 $\alpha$ -бром-5 $\beta$ -хидрокси дериват **9** (1,9%) и 6 $\beta$ -ацетокси-5 $\alpha$ -хидрокси дериват **10** (0,8%). Уклањањем ацетокси заштите код дибромидида **8** је добијен 3 $\beta$ -хидрокси дериват **11**. У синтези хлорхидрина **12**, као споредни производи су добијени епоксид **7** и 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -дихлорид **13**. Халохидрини су у овом раду добијени и из 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -епоксида **7**: бромхидрин **6** реакцијом са бромоводоничном киселином, хлорхидрин **12** реакцијом са бизмут(III)-хлоридом, а флуорхидрин **16** реакцијом са бортрифлуорид етератом.

5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Епоксид **7** је послужио и за добијање 5,6-дисупституисаних кисеоничних деривата. Наиме, његовим оксидативним отварањем са хром(VI)-оксидом или пиридинијум-хлорохроматом, добијен је 5 $\alpha$ -хидрокси-6-кето дериват **17**. Депротекцијом 3 $\beta$ -хидрокси групе једињења **17** добијен је 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -дихидрокси-6-кето дериват **18**. Редукијом кето групе једињења **18** добијен је 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -трихидрокси дериват **20**. 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Триол **20** је добијен и на следеће начине: 1) редукијом кето групе једињења **17**, а потом депротекцијом C3 хидроксилне групе; 2) вициналном дихидроксилацијом једињења **4**; 3) базном хидролизом ацетокси група код диацетата **10**. Једињење **20** је добијено и у реакцији метанолизе еоксида **7**, у којој су као главни производи добијени 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -дихидрокси-6 $\beta$ -метокси дериват **21** и 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -дихидрокси-5 $\alpha$ -метокси дериват **22**. Оксидацијом 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -дихидрокси-6-кето једињења **18** и 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -трихидрокси деривата **20** добијен је 5 $\alpha$ -хидрокси-3,6-дикето дериват **23**.

Полазећи од халохидрина **16**, **12** и **6** у реакцији са олово-тетраацетатом у апсолутном бензену и атмосфери аргона, уз додаток јода, калцијум-карбоната и озрачивањем сијалицом од 500 W, добијени су одговарајући 5 $\alpha$ -флуор-, 5 $\alpha$ -хлор- и 5 $\alpha$ -бром-6 $\beta$ ,19-епокси деривати **24**, **25** и **26** респективно. У реакцији добијања једињења **26**, као споредни производ је добијен 17 $\alpha$ -метокси дериват **27**. Оксидацијом једињења **26** хром(VI)-оксидом, као и Jones-овим реагенсом, добијена је 16,17-секо дикиселина **29**. За добијање једињења са 4-ен-3-он системом прво је код једињења **26** уклоњена ацетатна заштита C-3 хидроксилне групе, а затим је рађена оксидација добијеног алкохола **30**, при чему је добијен нестабилни 3-кето дериват **31**. Дехидрохалогеновањем једињења

**31** добијен је 4-ен-3-он дериват **32**.

Први у низу синтетисаних C19-дериватизованих једињења, 19-хидрокси дериват **33** је добијен редуктивним отварањем 6 $\beta$ ,19-епоксидног моста код једињења **25** и **26**, док флуорни дериват **24** није реаговао. Применом истих реакционих услова из 6,19-епокси-4-ен-3-она **32** је добијен 4-ен-19-ол-3-он **34**. Када је реакција редуктивног отварања једињења **32** рађена у глацијалној сирћетној киселини алкохол **34** је добијен у веома малом проценту, док је главни производ био 19-ацетокси дериват **35**.

Полазећи од алкохола **33** синтетисани су 19-хлорни дериват **36**, 5 $\beta$ ,10-циклопропил дериват **37**, 19-тозилокси дериват **38**, 19-алдехид **44** и 19-карбоксилна киселина **45**. Из једињења **38** су добијени 19-јодид **39** и 19-нор-6 $\beta$ -(*p*-толуенсулфонилоксиметил) дериват **41**. Када је код једињења **33** најпре извршена депротекција 3 $\beta$ -хидроксилне групе и добијени 3 $\beta$ ,19-диол **42** подвргнут оксидацији настао је 3,19-лактон **43**. Киселина **45** је послужила за добијање амида **46**.

И 19-оксо дериват **44** је искоришћен за даље хемијске трансформације и добијање других 19-дериватизованих једињења. Тако је реакцијом са хидроксиламином добијен 19*E*-оксим **47**, а депротекцијом његове 3 $\beta$ -хидроксилне групе је добијено једињење **48**. Дехидратацијом оксима **47** је добијен 19-нитрил **49**, чијом депротекцијом је синтетисан 3 $\beta$ -хидрокси-19-нитрил **50**. Алдехид **44** је подвргнут и реакцији Wittig-ове олефинације. Са метилтрифенилфосфонијум-јодидом, у присуству калијум-терц-бутоксидом добијени су 3 $\beta$ -хидрокси-19-метиленски дериват **52** и његов 3 $\beta$ -ацетокси аналог **51**. С обзиром да је у овој реакцији делимично долазило и до депротекције хидроксилне групе у положају C3, пре извођења наредних реакција са Wittig-овим реагентом је извршена базна хидролиза 3 $\beta$ -ацетокси групе једињења **44** и добијен је алкохол **53**. Његовом реакцијом Wittig-ове олефинације са илидом добијеним из (цијанометил)трифенилфосфонијум-хлорида изреаговало је само 23% полазног једињења, а настао је веома нестабилни 19-цијанометилиденски дериват **54**. Алдехид **53** са (хлорометил)трифенилфосфонијум-хлоридом и калијум-терц-бутоксидом као базом није реаговао, док је употребом бутил-литијума реаговао, при чему су добијена три производа чије структуре није било могуће утврдити због њихове велике нестабилности.

Орална биорасположивост свих новосинтетисаних једињења је испитана израчунавањем њихових физико-хемијских дескриптора и упоређивањем са параметрима за Lipinski и Veber правила. Израчунати параметри свих синтетисаних једињења су у складу са ограничењима Veber правила. Када су у питању Lipinski правила, код једињења **38** се јавља одступање у моларној маси, али ово не представља прекорачење укупног Lipinski критеријума. За једињења **8** и **41** постоји потенцијално одступање у израчунатом LogP, али пошто оно није потврђено и од стране другог коришћеног програма, ово прекорачење ограничења треба узети са резервом.

Антипролиферативна активност, која представља инхибицију раста ћелија, испитана је на шест неопластичних ћелија: MCF-7 (аденокарцином дојке, естроген рецептор позитиван), MDA-MB-231 (аденокарцином дојке, естроген рецептор негативан), PC-3 (карцином простате, андроген рецептор негативан), HeLa (карцином грлића материце), HT-29 (аденокарцином дебелог црева) и A549 (аденокарцином плућа), док је као контрола служила једна нормална хумана ћелијска линија (MRC-5 фибробласти плућа). Осим антипролиферативне активности, утврђени су корелациони односи између ове активности и структуре синтетисаних једињења. Најбољу антипролиферативну активност према MCF-7 ћелијској линији показао је 19-ацетокси-4-ен-3-он дериват **35** (IC<sub>50</sub> 1,71  $\mu$ M), а према MDA-MB-231 6 $\beta$ -метокси дериват **21** (IC<sub>50</sub> 3,38  $\mu$ M). Диацетат **10** се показао најпотентнијим према PC-3 ћелијама (IC<sub>50</sub> 6,60  $\mu$ M), а 5 $\alpha$ -метокси дериват **22** према HeLa (IC<sub>50</sub> 7,06  $\mu$ M). Најпотентнијим инхибитором пролиферације HT-29 ћелијске линије се показао 5 $\beta$ ,10-циклопропил дериват **37** (IC<sub>50</sub> 1,78  $\mu$ M), док су раст ћелија A549 најефикасније инхибирани 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол **20** (IC<sub>50</sub> 0,99  $\mu$ M) и 19-метиленски дериват **52** (IC<sub>50</sub> 0,50  $\mu$ M). Важно је истаћи да је према MRC-5 ћелијама од укупно 42 тестирана једињења само једињење **30** било активно.

У циљу утврђивања молекулских основа антипролиферативне активности извршен је виртуелни скрининг код одабраних синтетисаних једињења. Добијени резултати указују да 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол **20** и дикиселина **29** добру антипролиферативну активност према ћелијама карцинома плућа имају вероватно захваљујући инхибиторној активности према протеин киназама. Такође, антипролиферативна активност према ћелијама EP+ карцинома дојке једињења **9**, **20**, **35**, **46** и **47** вероватно води порекло у везивању за нуклеарне рецепторе и/или у инхибицији ензима ароматазе.

У оквиру *in vitro* тестова у овом раду је спроведено и испитивање везивања за естрогене и андрогене рецепторе. Ни једно од синтетисаних једињења није показало значајно везивање за ER $\alpha$  и ER $\beta$ , као ни за AR. Даље је урађено испитивање способности инхибиције ензима AKR1C3 за поједина синтетисана једињења. Утврђено је да 5,6-дисупституисана једињења и 6,19-епоксиди поседују слабу инхибиторну активност, док 19-дериватизована једињења повећавају активност овог ензима.

Закључци који су формулисани у дисертацији су логично изведени из добијених резултата и јасно одражавају значај и научни допринос спроведеног истраживања.

### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Кандидаткиња је веома студиозно приступила обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичке целине. У поглављима „Резултати и дискусија“ и „Експериментални део“ добијени резултати су адекватно представљени и дискутовани. Резултати истраживања су јасно и систематски изложени и добро илустровани помоћу прегледних схема, слика и табела.

Кандидаткиња је успешно применила савремене методе органске синтезе, а такође је показала и добро познавање физичко-хемијских метода, које је користила за доказивање структуре новосинтетисаних једињења. Поред тога, показала је и способност спровођења основних *in silico* тестова, као и добро разумевање и интерпретацију биолошких тестова. Све наведено указује да кандидаткиња има способност за интердисциплинарни приступ овој сложеној проблематици.

На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговоре на циљеве постављене у овој докторској дисертацији.

### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

#### **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?**

Да – Комисија оцењује да је ова докторска дисертација урађена у складу са образложењима наведеним у пријави теме.

#### **2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?**

Да – Дисертација садржи дефинисане теме истраживања, преглед познатих истраживања, јасан приказ добијених резултата и њихову дискусију, приказ експерименталних техника, списак литературе, закључак и прилог.

#### **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци**

У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је укупно 51 једињење, од којих су 44 нова. За сва стабилна новосинтетисана једињења је испитана биорасположивост поређењем израчунатих параметара са Lipinski и Veber критеријумима и антипролиферативна активност према шест туморских и једној здравој ћелијској линији. Нека од тестираних једињења су показала субмикромоларне IC<sub>50</sub> вредности. Такође, нека једињења су потентнија од комерцијалног цитостатика цисплатине, а за разлику од истог, потпуно су неактивна према здравим ћелијама. У циљу утврђивања молекулских основа антипролиферативне активности извршен је виртуелни скрининг, везивање за естрогене и андрогене рецепторе, као и инхибиција AKR1C3 ензима код одабраних једињења. Истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији су у сагласности са савременим трендовима који имају за циљ проналажење нових, ефикасних и селективних, антитуморских лекова, те стога резултати који су добијени у оквиру дисертације представљају значајан допринос у овој научној области. Део добијених резултата је публикован у раду категорије M22, што указује на квалитет и оригиналност ових истраживања.

Докторска дисертација је прошла проверу плагијарности применом софтвера iThenticate (<https://www.ithenticate.com/>), који је показао да проценат сличности износи 12% (према упутству произвођача све вредности испод 15% указују на оригиналан рад). Комисија закључује да је ова докторска дисертација оригинално дело и да не представља плагијат.

Комисија сматра да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног истраживања.

**4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања**

Комисија је мишљења да ова докторска дисертација нема недостатака, постављени циљеви су у потпуности испуњени.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу свега наведеног, Комисија предлаже да се прихвати позитивна оцена докторске дисертације под називом **“Синтеза и антитуморски потенцијал С19-дериватизованих стероидних D-хомо лактона”**, а кандидаткињи Ивани Кузминац одобри одбрана.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

---

Др Мирјана Попсавин  
ред. проф. ПМФ-а у Новом Саду, председник

---

Др Марија Сакач  
ред. проф. ПМФ-а у Новом Саду, ментор

---

Др Едвард Петри  
доцент ПМФ-а у Новом Саду, члан

---

Др Андреа Николић  
доцент ПМФ-а у Новом Саду, члан

---

Др Димитар Јакимов  
научни сарадник  
Медицинског факултета у Новом Саду