

**Наставно-научном већу
Универзитета у Београду - Хемијског факултета**

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаној 12. фебруара 2015. године одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Маријане Живковић, дипломираног хемичара, истраживача сарадника, запослене у Центру за хемију Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду под називом:

„Синтеза, карактеризација и биолошка активност деривата стероидних хидразона“

Пошто смо поднели дисертацију прегледали, подносимо Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Маријане Живковић написана је на 162 стране А4 формата, и садржи 19 слика, 23 схеме и 31 табелу. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (2 стране), Општи део (18 страна), Резултати и дискусија (65 страна), Експериментални део (65 страна), Закључак (2 стране) и Литература (10 страна). Поред наведеног, дисертација садржи Извод на српском и енглеском језику (по 1 страну), Листу скраћеница (3 стране), Садржај (6 страна), као и Биографију и Библиографију кандидата. Као електронски прилог на CD-у су дати спектри свих синтетисаних једињења (NMR, IR, HRMS).

У **Уводу** описан је предмет истраживања и истакнути су циљеви који се односе на карактеризацију свих новосинтетисаних једињења а потом на испитивање њихове биолошке активности. Такође, дат је и кратак садржај тезе кроз поглавља.

У **Општем делу** дат је преглед литературних података везаних за трансформације стероидних молекула заменом постојећих и/или увођењем нових хетеро-атома, функционалних група или хетероцикличних система које могу довести до промена у њиховој биолошкој активности. Посебан акценат дат је на аза-, окса- и тија-стероиде и њихове деривате. Посебно су приказани до сада синтетисани стероидни хидразони и њихови деривати, тиосеми- и семикарбазони, тијадиазолини и 1,3-тиазолидинони.

Поглавље **Резултати и дискусија** подељено је на две целине у којима је кандидаткиња детаљно приказала и продискутовала добијене резултате. У првом делу описана је синтеза нових стероидних деривата и дата њихова детаљна карактеризација и конфигурациона анализа укључујући и рендгенску структурну анализу. У другом делу описана је антимикуробна и антиканцерска активност добијених једињења одређена стандардизованим биолошким тестовима, одређивањем MIC вредности, односно зоне инхибиције и МТТ тестом. Ћелијски

циклус је испитиван проточном цитометријом док је тип ћелијске смрти одређен уз помоћ флуоресцентне микроскопије. Праћењем инхибиције циљних каспаза проточном цитометријом испитивани су сигнални путеви апоптозе изазване синтетисаним стероидним дериватима, а описана је и анализа антиангиогенског ефекта *in vitro*. Токсичност једињења је испитивана *Brine shrimp* тестом. На крају, извршено је и поређење реактивности и активности сумпорних и кисеоничних аналога.

У **Експерименталном делу** су описане процедуре за синтезу деривата стероидних хидразона и дата је детаљна спектроскопска карактеризација свих једињења. У наставку експерименталног дела описане су све методе примењене током израде дисертације а које се односе на биолошка испитивања, и наведени су коришћени материјали.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је сумирала резултате до којих је дошла у току израде докторске дисертације

У поглављу **Литература** (102 цитата) су обухваћене књиге, радови и други релевантни извори из области које дисертација садржи.

У прилогу на CD-у су дати спектри свих синтетисаних једињења (HRMS, IR, ^1H , ^{13}C и 2D NMR).

Б. Кратак преглед резултата

У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је и окарактерисано 50 нових стероидних деривата и то 11 моно- и бис-тиосемикарбазона, 11 моно- и бис-тијадиазолина, 12 моно- и бис-тиазолидин-4-она, 11 моно- и бис-семикарбазона и 5 карбазатних естара добијених из 3-моно-семикарбазона.

За синтезу једињења у овој дисертацији употребљени су различити поступци описани у литератури као и модификоване литературне процедуре.

Детаљном анализом NMR спектралних података утврђена је конфигурација стероидних хидразонских деривата у C-3 и C-17 положајима андростенских, односно C-3 и C-20 положајима прогестеронских деривата. Стереохемија је потом потврђена резултатима рендгенске структурне анализе за тијадиазолински дериват 19-норандростендиона, прво окарактерисано стероидно једињење које садржи шесточлани угљенични прстен кондензован са спиро-тијадиазолинским прстеном, као и за (3*E*)-андростендионски тиазолидинон, први стероидни дериват са познатом конфигурацијом двоструке везе C(3)=N.

In vitro цитотоксична активност свих синтетисаних стероидних моно- и бис-тиосемикарбазона и њихових деривата, моно- и бис-тијадиазолина и моно- и бис-тиазолидин-4-она, испитана је на шест ћелијских линија рака: ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), ћелијама хроничне мијелоидне леукемије (K562), две ћелијске линије карцинома дојке (MDA-MB-453 и MDA-MB-361), ћелијама аденокарцинома дебелог црева (LS174) и на ћелијама карцинома плућа (A549). Поред тога цитотоксичност ових једињења испитана је и на нормалним хуманим фибробластима плућа (MRC-5).

Седамнаест од 34 синтетисана тио-једињења испољила су веома јак цитотоксични ефекат према K562 ћелијама ($IC_{50} = 6,6-14,9 \mu M$), 14 према HeLa ћелијама ($IC_{50} = 7,6-18,9 \mu M$), 5 једињења према MDA-MB-453 ћелијама ($IC_{50} = 6,8-18,0 \mu M$) док је према MDA-MB-361 ћелијама 9 једињења испољило активност бољу или врло сличну активности цисплатина ($IC_{50} = 8,7-20,6 \mu M$). Према A549 ћелијама карцинома плућа 7 једињења је показало активност бољу од цисплатина али је њихово дејство према здравим ћелијама MRC-5 било још јаче.

Антиканцерски потенцијал најактивнијих деривата је затим испитан и на нормалним хуманим мононуклеарним ћелијама периферне крви (енгл. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), при чему је нађено да сва испитивана једињења имају врло низак токсични ефекат како према нестимулисаним тако и према митогеном стимулисаним PBMC ћелијама. При томе је коефицијент селективности за K562 и HeLa ћелије за осам једињења од којих су четири тиосемикарбазони (**2a**, **2b**, **2c** и **2f**), два тијадиазолини (**8a** и **8e**) и два тиазолидинони (**9a** и **10a**) био далеко већи од 2,5.

Морфолошком анализом HeLa ћелија третираних овим једињењима у трајању од 24 h уочена су типична обележја апоптозе ћелија што указује на проапоптотско дејство наведених деривата. Резултати проточне цитометрије потврдили су да испитана једињења проузрокују апоптозу, а одређивањем циљних каспаза установљено је да до апоптозе долази посредством каспазе-3, -8 и -9 и то како спољашњим тако и унутрашњим путем апоптозе. Сви испитивани деривати су показали и способност да инхибирају ангиогенезу EA.hy926 ћелија *in vitro*.

За оба испитана тиазолидинона утврђено је да не проузрокују значајне промене у нивоима експресије гена *MMP2*, *MMP9* и *VEGFA* код HeLa ћелија.

Сви новосинтетисани семикарбазони и карбазатни естри испољили су далеко нижу *in vitro* цитотоксичну активност према испитиваним малигним ћелијама (HeLa, K562 и Jurkat) у поређењу са њиховим тио-аналозима тако да за њих нису рађени додатни тестови за испитивање механизма цитотоксичног деловања.

Сва тестирана једињења показала су врло слабу антимикуробну активност.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Стероиди су широко распрострањена једињења којих има у скоро свим живим организмима. Због тога су модификације крутог тетрацикличног стероидног система које изазивају промене у њиховим физиолошким функцијама и које воде ка стварању нових, биолошки активних молекула, постале један од главних циљева данашње стероидне хемије. У том погледу нарочито се истичу трансформације које укључују увођење хетероатома (азот, сумпор или кисеоник), нових функционалних група као и формирање различитих хетероцикличних прстенова. Као резултат тога, до сада су већ описане одређене структурне модификације на прстеновима А, Б и Д у које је инкорпориран хетероатом или на којима је као супституент уведена нова функционална група или хетероциклични прстен (пиразоли, пиразолини, изоксазолини, тиазоли, тијадиазоли, пиридини, пиримидини, имидазоли, оксатиофосфолани). Утврђено је да овако модификовани стероидни молекули

показују различите антипролиферативне, антимикробне, антиинфламаторне, хипотензивне, хипохолестеролемичне и диуретичке активности.

С друге стране и супституисани хидразонски деривати привлаче значајну пажњу због свог занимљивог биолошког понашања. Познато је да једињења са тиосемикарбазонском структуром поседују антибактеријска, антифунгална и антиинфламаторна својства. Поред тога, тиосемикарбазони су значајни за синтезу хетероцикличних једињења, нарочито оних која садрже сумпор и азот. Међу њима, од великог значаја су тиазоли, тиазолидинони и тијадиазолини, будући да они представљају структурне оквире неколико природних алкалоида који су нашли фармацеутску и индустријску примену. Они могу да делују као антихипертензивни, антитуморски, антибактеријски и антифунгални агенси. Такође, тиосемикарбазони су важна једињења и као могући лиганди за стварање металних комплекса.

Допринос ове дисертације огледа се у томе што је синтетисано 50 нових стероидних деривата и то 11 моно- и бис-тиосемикарбазона, 11 моно- и бис-тијадиазолина, 12 моно- и бис-тиазолидин-4-она, 11 моно- и бис-семикарбазона и 5 карбазатних естара добијених из 3-моно-семикарбазона. По први пут урађена је детаљна конфигурациона анализа стероидних хидразонских деривата у С-3 и С-17 положајима андростенских, односно С-3 и С-20 положајима прогестеронских деривата. Структура и стереохемија су потом потврђене резултатима рендгенске структурне анализе за спиро-тијадиазолински дериват 19-норандростендиона **7a** и (3*E*)-андростендионски тиазолидинон **9b-E**. Тијадиазолин **7a** је прво окарактерисано стероидно једињење које садржи шесточлани угљенични прстен кондензован са спиро-тијадиазолинским прстеном. До момента објављивања кристалне структуре тиазолидинона **9b-E** постојало је само једно структурно окарактерисано једињење са 2-(3-циклохексен-1-илиденхидразоно)тиазолидин-4-онским фрагментом. Једињење **9b-E** је први стероидни дериват са познатом конфигурацијом двоструке (С-3)=N везе хидразоно-тиазолидин-4-онског фрагмента.

На основу урађених експеримената утврђено је да замена тиоксо-групе деривата стероидних хидразона карбонилном групом доводи до драматичног смањења њихове цитотоксичне активности. Такође, утврђено је да α,β -незасићени тиосемикарбазонски супституент у положају С-3, спиро-хетероциклични супституент у положају С-17 као и хетероциклични 4-тиазолидинонски прстен у положају С-3, а нарочито у положају С-17 односно С-20, значајно повећавају активност испитиваних једињења.

Захваљујући њиховом јаком антипролиферативном и проапоптотском ефекту према малигним ћелијама као и високој селективности према малигним у односу на нормалне ћелије резултати спроведених *in vitro* испитивања у овом докторату указују на значајан антиканцерски потенцијал новосинтетисаних стероидних тиосемикарбазона **2a**, **2b**, **2c** и **2f**, тијадиазолина **8a** и **8e** и тиазолидинона **9a** и **10a**. Добијени резултати упућују на то да су једињења описана у овој тези значајна и да завређују даља испитивања која укључују и *in vivo* процену њихове антиканцерске ефикасности.

Г. Објављени и саопштени радови који су део докторске дисертације

Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21)

1. Marijana B. Živković, Ivana Z. Matić, Marko V. Rodić, Irena T. Novaković, Dušan M. Sladić, Natalija M. Krstić, **Synthesis, characterization and *in vitro* cytotoxic activities of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines**, RSC Advances, (2016), **6**: 34312–34333.
Chemistry, Multidisciplinary (33/157)
IF: 3,840 (2014)
DOI: <https://doi.org/10.1039/C6RA01516F>
2. Marijana B. Živković, Ivana Z. Matić, Marko V. Rodić, Irena T. Novaković, Ana M. Krivokuća, Dušan M. Sladić, Natalija M. Krstić, **Anticancer potential of new steroidal thiazolidin-4-one derivatives. Mechanisms of cytotoxic action and effects on angiogenesis *in vitro***, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, (2017), **171**: 72–85.
Biochemistry & Molecular Biology (60/286)
IF: 4,561 (2016)
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jsbmb.2017.07.031>

Радови објављени у истакнутим међународним часописима (M22)

1. Marijana B. Živković, Irena T. Novaković, Ivana Z. Matić, Dušan M. Sladić, Natalija M. Krstić, **Synthesis and preliminary screening for the biological activity of some steroidal Δ^4 -unsaturated semicarbazone derivatives**, Steroids, (2019), **148**: 36–46.
Biochemistry & Molecular Biology (174/293)
IF: 2,523 (2017)
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.04.010>

Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34)

1. Marijana B. Živković, Irena T. Novaković, Srđan Tufegdžić, Jovana Vilipić, Marko Jeremić, Dušan Sladić, Natalija Krstić, **Synthesis, characterization and *in vitro* antimicrobial activity of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines**, XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, October 8–11, 2014, Ohrid, Macedonia, Book of Abstracts MPCE 009, page 178.
2. I. Matic, M.B. Zivkovic, N.M. Krstic, D.M. Sladic, **Anticancer potential of novel steroid derivatives**, 2nd EACR-AACR-SIC SPECIAL CONFERENCE 2017, The Challenges of Optimising Immuno and Targeted Therapies From Cancer Biology to the Clinic, June 24–27, 2017, Florence, Italy, Proceedings Book Abstract 240, page 79
3. Uroš Čakar, Marijana Živković, Ivana Matić, Dušan Sladić, Natalija Krstić, **Synthesis and *in vitro* cytotoxic activities of some novel steroidal semicarbazones**, FIP 2017, Pharmacy and Pharmaceutical Science World Congress, Seoul, Republic of Korea, 10–14 September 2017.
<http://www.fip.org/abstracts?page=abstracts&action=item&item=19295>

Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у изводу (M64)

1. Marijana B. Živković, Ivana Z. Matić, Dušan M. Sladić, Natalija M. Krstić, **Anticancer potential of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines**, Third Conference of Young Chemists of Serbia, October 24, 2015, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts BB P 08, page 67

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена 07. августа 2019. године на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да количина подударња текста износи 32 %. Овај степен подударности последица је претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, што је у складу са чланом 9. овог правилника. Највећи проценат подударности (27%) односи се на радове проистекле из ове дисертације и то на експериментални део, услед обиља спектралних и кристалографских података. У тим радовима Маријана Живковић је први аутор и они су наведени у Литератури под редним бројевима 61, 62 и 63.

Стога сматрамо да је докторска дисертација Маријане Живковић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

У приложеној докторској дисертацији под насловом „**Синтеза, карактеризација и биолошка активност деривата стероидних хидразона**” кандидаткиња Маријана Живковић је успешно одговорила на постављене задатке и циљеве који се односе на осмишљавање синтезе, добијање и карактеризацију нових стероидних хидразона и њихових деривата, као и на одређивање њихове биолошке активности, токсичности и механизма дејства.

Резултати истраживачког рада кандидата публиковани су у оквиру три научна рада, која су проистекла директно из докторске дисертације (два рада у часописима категорије M21 и један рад у часопису категорије M22). Додатно, резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације су саопштени и на четири научна скупа (три међународног значаја и један националног значаја).

На основу детаљног прегледа Комисија сматра да добијени резултати поднети у приложеној докторској дисертацији представљају оригиналан научни допринос у области органске и медицинске хемије и представљају целовито и темељно истраживање које обухвата добијање нових цитотоксичних агенаса селективног дејства и осветљавања њиховог механизма дејства.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Научно-наставном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Маријане Живковић под насловом „**Синтеза, карактеризација и биолошка активност деривата стероидних хидразона**” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора хемијских наука.

У Београду, 09. августа 2019. године

др Душан Сладић, редовни професор
Хемијског факултета Универзитета у Београду, ментор

др Наталија Крстић, научни саветник
ИХТМ-Центра за хемију Универзитета у Београду, ментор

др Катарина Анђелковић, редовни професор
Хемијског факултета Универзитета у Београду

др Ирена Новаковић, виши научни сарадник
ИХТМ-Центра за хемију Универзитета у Београду

др Ивана Матић, научни сарадник
Института за онкологију и радиологију Србије