

## ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Иване Ковачевић

<p><b>I. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b></p> <p><b>1. Датум и орган који је именовао комисију:</b> Комисију именovalo Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, на својој 31. седници, одржаној 27. 02. 2015. год.</p> <p><b>2. Састав комисије са знаком 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. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, председник</li> <li>• Др Велимир Попсавин, редовни професор, ужа научна област Органска хемија и Биохемија, датум избора 06. 08. 1999. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор</li> <li>• Др Марија Сакач, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора 08. 11. 2007. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, члан</li> <li>• Академик др Богдан Шолаја, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора 21. 09. 2000. године, Хемијски факултет, Београд, члан</li> </ul>
<p><b>II. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b></p> <p><b>1. Име, име једног родитеља, презиме:</b> Ивана Миодраг Ковачевић</p> <p><b>2. Датум рођења, општина, држава:</b> 19. 03. 1985., Врбас, Србија</p> <p><b>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив:</b> Природно-математички факултет, Биохемија, Мастер биохемије</p> <p><b>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:</b> 2008. године, Докторске 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> Природни стирил-лактони, њихови деривати и аналози као потенцијални антитуморски агенси: Дизајн, синтеза и SAR испитивања</p>
<p><b>IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Број поглавља: 10 (укључујући поглавље Прилог). Страна: 237 (64 стране поглавља Прилог I, 19 страна поглавља Прилог II). Лит. цитата: 153. Табела: 126 (86 табела у Прилогу II). Схема: 53. Слика: 250 (126 слика NMR спектра у Прилогу I, 86 слика у Прилогу II)</p>

## V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу **УВОД** образложени су и дефинисани циљеви истраживања који подразумевају развој нових поступака синтезе одабраних природних стирил-лактона (гониобутенолида А и Б, кардиобутанолида, 3-деокси-кардиобутанолида, красалактона Д), као и дизајн и синтезу одговарајућих нових деривата и аналога. Процена цитотоксичности *in vitro*, успостављања корелационих односа између структуре и биолошке активности, односно испитивање механизма антитуморског дејства синтетизованих једињења био је додатни важан задатак овог рада.

Циљеви истраживања су представљени јасно и прецизно.

У одељку **ОПШТИ ДЕО** приказан је преглед литературе који се односи на синтезу природних производа гониобутенолида А и Б, кардиобутанолида и красалактона Д.

Приказан преглед литературе је одговарајући, јасан и сажет.

У поглављу **НАШИ РАДОВИ** приказани су и дискутовани резултати добијени у истраживању. Подељени су у подпоглавља:

- Дизајн аналога и деривата красалактона Д и кардиобутанолида
- Стратегија синтезе и избор полазног материјала
- Синтеза гониобутенолида А и Б и красалактона Д
- Синтеза цинаматних деривата красалактона Д и аналога
- Синтеза халогенованих деривата красалактона Д
- Синтеза кардиобутанолида и аналога
- Синтеза 3-деокси-кардиобутанолида
- Испитивање антипролиферативне активности
- Успостављање корелационих односа између структуре синтетизованих једињења и антипролиферативне активности (SAR)
- Испитивање механизма антитуморског дејства

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

У **Експерименталном делу** рада су детаљно описани поступци синтезе интермедијера и финалних производа, као и потпуна карактеризација синтетизованих једињења (асигнације NMR, IR, М-спектра,  $R_f$  вредности, угао оптичке ротације, односно тачка топљења за кристалне супстанце).

Јасно и прегледно изведени закључци из резултата приказаних у одељку Наши радови су приказани у поглављу **Закључак**, а одговарајући закључци на енглеском језику су приказани у поглављу **Summary**.

Одељци **Прилог I** и **Прилог II**, који су дати само у електронској форми (CD), садрже скениране слике  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектра свих синтетизованих једињења што доприноси лакшем праћењу дела текста у одељку Наши радови, који се односи на тумачење спектроскопских доказа структуре синтетизованих једињења, као и слике и табеле Western blot анализе, апоптозе и ћелијског циклуса тестираних једињења што доприноси лакшем праћењу дела текста у одељку Наши радови, који се односи на тумачење механизма биолошког дејства синтетизованих једињења.

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

1. G. Benedeković, M. Popsavin, J. Francuz, I. Kovačević, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Divjaković, V. Popsavin: "Design, synthesis and SAR analysis of antitumour styryl lactones related to (+)-crassalactones B and C", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 87, 237. [IF 3.432 (2013, 13/58); M21 (8)]
2. G. Benedeković, J. Francuz, I. Kovačević, M. Popsavin, B. Srećo Zelenović, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Divjaković, V. Popsavin: "Conformationally constrained goniofufurone mimics as inhibitors of tumour cell growth: Design, synthesis and SAR study", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 82, 449. [IF 3.432 (2013, 13/58); M21 (8)]
3. V. Popsavin, I. Kovačević, G. Benedeković, M. Popsavin, V. Kojić, G. Bogdanović: Divergent synthesis of cytotoxic styryl lactones related to goniobutenolides A and B, and to crassalactone D, *Organic Letters*, **2012**, 14, 5956–5959. [IF 6.142 (2012, 5/55); M21 (8)]

## VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У раду је остварена тотална синтеза природних стирил-лактона гониобутенолида А (I) и Б (II), красалактона Д (III) и 3-деокси-кардиобутанолида (Ve) из заједничког интермедијера 7. Лактол 7 је синтетизован из моноацетонида 3, који се лако добија из D-глукозе, након заштите слободних хидроксилних група у облику цикличног карбоната уз накнадну хидролизу 1,2-*O*-изопропилиденске заштите. Кључни корак синтезе је нова “one pot” каскадна секвенца која почиње *Z*-селективном Wittig-овом, или Horner-Wadsworth-Emmons-овом (HWE), олефинацијом, а интермедијерно награђени олефин накнадно подлеже спонтаној лактонизацији. Базна средина реакционе смесе изазива депротоновање водоника са C-4, што даље води до спонтане декарбоксилације и настајања I и II. Виши принос I и II је добијен у условима HWE олефинације (44%, *Z/E* ~ 2:1) него у условима Wittig-ове олефинације (30%, *Z/E* ~ 2:1). У овим реакцијама као споредни производи настали су красалактон Д (III) и његов C-4 епимер IV, као последица 5-*ендо*-триг спироциклизације I и II узроковане нуклеофилним нападом хидроксилне групе са C-7 на C-4. Након продужења времена Wittig-ове реакције и оптимизације реакционих услова спиролактони III и IV су изоловани као главни реакциони производи (III/IV ~ 1:2, 51%). Третманом мање стабилног изомера IV са трифлуорсирћетном киселином у хлороформу формирана је 2:1 смеша III/IV (97%). Применом исте реакционе секвенце на стереоизомер 4 добијен је лактол 8 који је затим преведен у одговарајуће 7-епимере: (7*S*)-гониобутенолид А (VIII) и Б (IX), (7*S*)-красалактон Д (VI) и (4*R*,7*S*)-красалактон Д (VII). На овај начин успешно је остварена оригинална и ефикасна синтеза гониобутенолида А и Б, односно красалактона Д и њихових C-7 епимера. Ови резултати су публиковани у престижном међународном часопису категорије M21 (рад под редним бројем 3, стр. 2).

Стереоселективном олефинацијом лактола 7 са триметил-фосфоноацетатом добијен је *E*-еноат 22. „One-pot“ хидрогеновање 22, у присуству PtO<sub>2</sub>, уз накнадно уклањање карбонатне заштите натријум-метоксидом, било је праћено лактонизацијом, при чему је добијен 3-деокси-кардиобутанолид (Ve; 74%).

Естерификацијом лактона III, IV, VI и VII са цинамоил-хлоридом, 4-нитроцинамоил-хлоридом, 4-метоксициметном киселином и 4-флуороциметном киселином синтетизовани су одговарајући цинамоати IIIa-d, IVa-d, VIA-d и VIIa-d.

Халоетерификацијом незасићених лактона I, II, VIII и IX синтетизовани су нови 5-халогеновани деривати красалактона Д (IIIe,f, IVe-h, VIe,f и VIIe-g).

Синтеза природног кардиобутанолида (V), његових стереоизомера Va-c и дефенилованог аналога Vd остварена је из заједничког интермедијера 11, који је добијен из D-ксилозе у три синтетске фазе, које обухватају: кондензацију D-ксилозе са Meldrum-овом киселином, супституцију примарне хидроксилне групе јодом у условима Garegg-Samuelsон-ове реакције и редуктивно отварање тетрахидрофуранског прстена са активираним цинком. Реакцијом диола 11 са 2,2'-диметоксипропаном добијен је ацетонид 14. Укрштеном олефинском метатезом 11 и 14 са стиреном, у присуству Grubbs-овог катализатора друге генерације, формиран су *E*-олефини 12 и 13. Дихидроксилацијом 12 са OsO<sub>4</sub> финализована је ефикасна петофазна синтеза (7*S*)-кардиобутанолида (Va) и (6*S*)-кардиобутанолида (Vb) без употребе заштитних група. Селективна синтеза Va и Vb постигнута је асиметричном дихидроксилацијом 13 са AD-mix-а, односно β која је праћена хидролитичким уклањањем изопропилиденске заштите из 20 и 21. Кардиобутанолид (V) и његов (6*S*,7*S*)-стереоизомер Vc су добијени дихидроксилацијом *Z*-олефина 18, који је синтетизован реакционом секвенцом која обухвата дихидроксилацију 14, оксидативно раскидање диола 15, олефинацију алдехида 16 и депротекцију *Z*-олефина 17. Дефениловани дериват Vd је формиран након уклањања изопропилиденске заштите из ацетонида 15.

Након синтезе, испитан је утицај пет синтетизованих природних лактона и 36 њихових деривата и аналога на пролиферацију десет малигних (K562, HL-60, Jurkat, Raji, HT-29, PC3, MDA-MB231, MCF-7, HeLa i A549) и једне нормалне хелијске линије (MRC-5) применом МТТ теста. Установљено је да сви испитани молекули (I, II, III, IIIa-f, IV, IVa-h, V, Va-e, VI, VIa-f, VII, VIIa-g, VIII i IX), у већој или мањој мери, инхибирају раст малигних хелија.

Према хелијској линији K562 субмикромоларну активност показују молекули I, III, IV, IVh, VII, VIII, V и Ve при чему су III, IVh, VIII и V активнији од комерцијалног антитуморског агенса доксорубицина (DOX) 2.1, 1.4, 1.7 и 5 пута. Молекули I, VII, V, Vd и Ve су субмикромоларну активност показали и према HL-60 хелијама, а били су активнији од доксорубицина 3.7, 4.8, 3.8, 1.2 и 10.2 пута, респективно. Као најјачи инхибитор пролиферације Jurkat хелија се показао бромидни дериват VIIg (IC<sub>50</sub> 0.03 μM), али су изузетно активни и аналози III, IIIa, IV, VIII, V, Vd и Ve. Чак 12 једињења је активније од DOX према хелијама Burkitt-овог лимфома (Raji): III, IVa, IVg, Va, VIe, VIg, VII, VIIg, V, Va, Vd и Ve. Према MCF-7 хелијама субмикромоларну и микроларну активност показује 29 испитаних једињења, од којих су VIe, VIg и VIIg активнији од DOX 1.2, 20 и 4 пута. Субмикромоларну и микроларну активност према MDA-MB 231 хелијама показује 19 једињења, а према HeLa 26. Јаку цитотоксичност према хелијама аденокарцинома плућа (A549) показује десет једињења од којих су чак осам активнији од DOX.

Ни једно од испитиваних једињења није било активно према нормалној хелијској линији MRC-5.

Успостављањем корелационих односа између структуре и антитуморске активности (SAR) у циљу утврђивања утицаја природе функционалних група, односно стереохемије, на антитуморску активност синтетизованих једињења нађено је: (а) да су молекули са Z-конфигурацијом активнији од E-изомера; (б) да у случају (7R) изомера (III и IV) промена конфигурације из (4S) у (4R) води до смањења биолошке активности, а у случају 7S изомера (VI и VIII) и свих цинамоата (IIIa-d, IVa-d, VIa-d, VIIa-d) иста промена води до појачавања цитотоксичности, (в) да у случају цикличних молекула (III, IV, VI, VIII) (7R) конфигурација утиче на повећање антипролиферативне активности, а код ацикличних (I, II, VIII, IX) и цикличних естарских деривата (7S); (г) да електрон-донорска група (OMe) у пара положају цинамоил-остатака утиче повољније на антипролиферативну активност од електрон-акцепторских група (F, NO<sub>2</sub>); (д) да присуство атома халогена у структури спиро-лактона углавном доприноси повећању биолошке активности; (ђ) да присуство брома и јода у структурама испитаних лактона повољније утиче на активност од хлора; (е) да промена конфигурације на појединачним стереоцентрима природног кардиобутанолида (V) из (7R) у (7S) и из (6R) у (6S), води до смањења биолошке активности; (ж) да одсуство фенил-групе повољно утиче на повећање биолошке активности молекула типа кардиобутанолида; (з) да је присуство хидроксилних група у структури овог типа молекула изузетно важно за цитотоксичну активност.

Применом проточне цитометрије је установљено да тридесет шест од четрдесет једног синтетизованог једињења повећава проценат K562 хелија у суб G1 фази у односу на контролу, од којих је најпотентнији лактон IVa (56.93% хелија). Високе вредности (>30%) специфичне апоптозе детектоване су након третмана са петнаест једињења, при чему седам једињења уводи у апоптозу више од 80% хелија. Халогенид VIIe индукује највећи проценат специфичне апоптозе (86.29%). Семи-квантитативном Western blot методом је испитана експресија маркера апоптозе (Bcl-2, Вах, каспаза 3, PARP) након третмана K562 хелија синтетизованим једињењима, на основу чега се може претпоставити да пет једињења (IVe, VIIa,b,d и IX) индукују апоптозу каспаза-зависним путем, четири једињења (IIIb,f, VI и VIIc) каспаза-независним путем, седамнаест једињења (I, II, IV, VII, VIII, IVa,g,h, Va,b,e, VIb,c,d и VIIe,f,g) каспаза-зависним путем регулисаним Bcl-2 фамилијом протеина и тринаест једињења (IIIa,c,d, IVb,c,d,f, V, Vc,d и VIa,e,f) каспаза-независним путем регулисаним Bcl-2 фамилијом протеина. Два једињења (III и IIIe) смањују експресију свих испитаних протеина те се механизам њиховог дејства на основу ових резултата не може поуздано тврдити.

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

### VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидат је успешно систематизовала у логичке целине рационално обрађене и анализиране обимне експерименталне податке. Резултати веома актуелних и исцрпних истраживања су аналитички изложени, а где је то било неопходно статистички су обрађени (нпр. код биолошких тестова). Добијени резултати су детаљно дискутовани и критички упоређени са расположивим резултатима из литературе. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговоре на задатке и циљеве постављене у пријави ове докторске дисертације.

### IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Комисија оцењује да је докторска дисертација урађена потпуно у складу са образложењима наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Дисертација садржи све битне елементе – дефинисање теме истраживања, преглед постојећих истраживања, детаљан приказ експерименталних техника, јасан и прегледан приказ резултата и њихову дискусију, списак литературе и закључак.

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

Комисија сматра да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног рада. Развијени су нови и оригинални поступци дивергентне синтезе четири природна производа (гониобутенолида А и Б, красалактона Д и 3-деокси-кардибутанолида) и 32 деривата, односно аналога вештачком синтезом полазећи из D-глукозе. Синтеза природног стирил-лактона, кардибутанолида и одговарајућа четири нова деривата изведена је полазећи из D-ксилозе. Испитан је утицај синтетизованих једињења на инхибицију раста 10 туморских и једне нормалне ћелијске линије. Успостављене су корелације између структуре и антипролиферативне активности (SAR) добијених једињења, а испитан је и механизам њиховог антитуморског дејства применом проточне цитометрије и Western blot анализе. У литератури до сада нису објављена овако детаљна испитивања поменутих природних производа и њихових аналога. Део добијених резултата публикован је у облику три научна рада, категорије М21 што указује на висок квалитет и оригиналност спроведених истраживања. При томе, рад под редним бројем 3 на страни 2, садржи скоро искључиво резултате из докторске дисертације кандидата, док преостали радови такође садрже резултате из дисертације у комбинацији са резултатима других сарадника из лабораторије.

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

Комисија је мишљења да ова докторска дисертација не садржи било какве недостатке.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу свега наведеног, комисија предлаже да се прихвати позитивна оцена докторске дисертације под насловом: “Природни стирил-лактони, њихови деривати и аналози као потенцијални антитуморски агенси: дизајн, синтеза и SAR испитивања” и да се кандидату Ивани Ковачевић одобри одбрана.

**КОМИСИЈА:**

Др Мирјана Попсавин, редовни професор Природно-математичког факултета у Новом Саду, председник

Др Велимир Попсавин, редовни професор Природно-математичког факултета у Новом Саду, ментор

Др Марија Сакач, редовни професор Природно-математичког факултета у Новом Саду, члан

Академик др Богдан Шолаја, редовни професор Хемијског факултета у Београду, члан

У НОВОМ САДУ И БЕОГРАДУ,  
02. 03. 2015.