

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**  
**Технолошко-металуршки факултет**

### **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Мохамеда Х. Асалеха (Mohamed H. Assaleh)

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета бр. 35/56 од 10.03.2022. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Мохамеда Х. Асалеха (Mohamed H. Assaleh) под насловом

**„ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)“**

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

### **РЕФЕРАТ**

#### **1. УВОД**

##### 1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

2015/2016. – године кандидат Мохамед Х. Асалех (Mohamed H. Assaleh) је уписао докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Хемија.

13.05.2021. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука бр. 35/121 о именовању чланова комисије за оцену подобности теме и кандидата Мохамеда Х. Асалеха, за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом **„ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)“**

08.07.2021. – Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета донело је одлуку бр. 35/180 о прихватању Реферата за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације Мохамеда Х. Асалеха под називом **„ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)“**. За менторе именовани су др

Александар Маринковић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др сц. мед. Снежана Бјелогрић, виши научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије.

23.09.2021. – На седници Већа научних области природних наука Универзитета у Београду дата је сагласност 02-07 Број: 61206-3534/2-21 на предлог теме докторске дисертације

Мохамеда Х. Асалеха под називом „ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)“.

10.03.2022. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука бр. 35/56 о именовану чланова Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Мохамеда Х. Асалеха под називом „ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)“.

## 1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Хемијске науке и ужој научној области органска хемија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Ментори су др Александар Маринковић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, и др сц. мед. Снежана Бјелогрић, виши научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије, који су на основу досадашњих објављених публикација и искуства компетентни да руководе израдом ове докторске дисертације.

## 1.3. Биографски подаци

Мохамед Х. Асалех је рођен 1982. године у Алзавији (Alzawiyah), Либија (Libya). Школске 2003/2004. завршио је основне студије и дипломирао на одсеку за Хемију Универзитета Алгабал Алгарби (Algabal Algarbi), Факултет за науку, Алзавија, Либија са просечном оценом 57,33%. Кандидат је 2009. године похађао курс за међународну дозволу за коришћење рачунара International Computer Driving License (Excel, Word, PowerPoint, Access, and Internet) и курс за обуку у Лабораторији за хемијске анализе Универзитета Триполи, Либија. Мохамед Х. Асалех је 2012. године завршио курс за обуку о Примени токсикологије, Laboratory of the Government Chemist (LGC) Forensics, Оксфорд (Oxford), Велика Британија и курс за Менаџмент квалитетом (примењени курс) Универзитета у Хадерсфилду (Huddersfield), Велика Британија. Кандидат је истовремено 2012. године завршио мастер студије на смеру форензичка токсикологија под насловом: Испитивање уличних дрога (Roadside drug testing) на Универзитету у Хадерсфилду, Велика Британија. Програм је похађао на Енглеском језику уз просечну оцену од 72%. Након тога, школске

2015/2016 године Мохамед Х. Асалех је уписао докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Хемија, и положио све испите, а школске 2016/2017 положио завршни испит. Од 2016. до 2019. године, у оквиру истраживачке групе на катедри за Органску хемију, као сарадник је учествовао на међународној сарадњи истраживача COST Action CM1407 „*Challenging organic synthesis inspired by nature: from natural product chemistry to drug discovery*“.

Научно-истраживачки рад Мохамеда Х. Асалеха обухвата синтезу, физичко-хемијску карактеризацију, теоријска проучавања и испитивање биолошке активности имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина, као и деривата никотинске киселине. Битна област истраживања кандидата односи се на успостављање везе између структуре и биолошке активности ових класа једињења (QSAR). Мохамед Х. Асалех је објавио три рада у часописима међународног значаја (M22), једно саопштење са међународног скупа штампаног у целини (M33)) и два саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34).

## 2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Мохамед Х. Асалеха је написана на енглеском језику на 154 стране (А4 формата, фонт 12, проред 1,0) и садржи укупно 110 слика (63 слике у прилогу), 14 шема, 14 табела и 273 литературна навода. Докторска дисертација је подељена на следећа поглавља: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак, Литература и Прилози. Такође, садржи Извод на енглеском и српском језику, Листу скраћеница и симбола и Садржај. На крају дисертације дата је биографија кандидата и четири потписане изјаве: Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу и Провера оригиналности докторске дисертације.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

**Увод** садржи преглед главних циљева дисертације и предмет истраживања и истакнут је значај синтезе нових и испитивања познатих имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина. Дат је кратак осврт на структурну карактеризацију синтетисаних деривата експерименталним техникама и приказан је преглед биолошких испитивања.

**Теоријски део** садржи преглед литературних релевантних истраживања у вези метода синтезе имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина. У њему је дат преглед основних својстава циметне киселине и њених деривата, структуре и класификације и истакнут је њен значај као киселине са разноврсним биолошким својствима. Такође, приказани су хидразони дихидразида тиоугљене киселине уз осврт на њихову синтезу, значај, својства и примену. Поред тога, дат је литературни преглед до сада урађених синтеза и карактеристичних реакција ових једињења. Приказани су резултати публикованих истраживања који се односе на релевантне податке о биолошкој

активности једињења која се разматрају у поднесеној тези: антиоксидативне, антимикробне и антиканцер активности. У оквиру Теоријског дела приказан је и литературни преглед метода теорије функционала густине (енгл. *Density Functional Theory*, DFT) које се користе за квантно-хемијско израчунавање електронске структуре молекула, као и методологија која се користи за анализу односа структуре и активности једињења (QSAR).

**Експериментални део** обухвата списак коришћених хемикалија и лабораторијске опреме. У овом делу дат је детаљан опис поступака синтезе испитиваних једињења. Реакцијом кондензације 2-хидроксибензалдехида (салицилалдехида; **sal**) или 1-(пиридин-2-ил)етанона (2-ацетилпиридина; **2ap**) са дихидразидом тиоугљене киселине при молском односу 0,5:1 добијени су монохидразони дихидразида тиоугљене киселине (**m-TCH**) и то [(2-хидроксифенил)метилен]карботиохидразид (**m-TCH<sub>sal</sub>**) и [1-(2-пиридинил)-етилиден]карботиохидразид (**m-TCH<sub>2ap</sub>**). Симетрични деривати дихидразона дихидразида тиоугљене киселине (**b-TCH**) су синтетисани реакцијом кондензације **2ap** или **sal** са дихидразидом тиоугљене киселине при молском односу 2,1:1 при чему су добијени 2,2'-bis[(2-хидроксифенил)метилен]карботио-дихидразид (**b-TCH<sub>sal</sub>**) и 2,2'-bis[1-(2-пиридинил)-етилиден]карботио-дихидразид (**b-TCH<sub>2ap</sub>**). Синтетисани **m-TCH** и **b-TCH** деривати припадају првој серији једињења.

Имино деривати амида (2*E*)-3-фенил-2-пропенске киселине (циметна киселина; **Cim**) и (2*E*)-3-(супституисаних фенил)-2-пропенских киселина (фенил супституисаних циметних киселина) са следећим супституентима: 3-хлор- – 3-хлорциметна киселина, **3-ClCim**; 4-хлор- – 4-хлорциметна киселина, **4-ClCim**; 4-метокси- – 4-метоксициметна киселина, **4-MeOCim**; 3-хидрокси- – 3-хидроксициметна киселина, **3-OHCim**; 4-хидрокси-3-метокси- – 4-хидрокси-3-метоксициметна киселина (ферулна киселина), **Fer**; 3,4-дихидрокси- – 3,4-дихидрокси-циметна киселина (кафена киселина), **Caf**; су синтетисани применом две методе (друга серија једињења). Прва метода се изводи у два корака. У првом кораку синтезе, кондензацијом пиридин-2-карбалдехида (**2fp**) или 8-хидроксихинолин-2-карбалдехида (**8OH2qu**) са дихидразидом тиоугљене киселине синтетисана су два **m-TCH** интермедијера: [(2-пиридинил)метилен]карботиохидразид (**m-TCH<sub>2fp</sub>**) и [(8-хидрокси-2-хинолинил)метилен]карботиохидразид (**m-TCH<sub>8OH2qu</sub>**). У другом кораку је вршена кондензација синтетисаних **m-TCHs** (**m-TCH<sub>2fp</sub>**, **m-TCH<sub>sal</sub>**, **m-TCH<sub>2ap</sub>** и **m-TCH<sub>8OH2qu</sub>**) са синтетисаним хлоридима циметне (**Cim**) и супституисаних циметних киселина (**3-ClCim**, **4-ClCim** и **4-MeOCim**) при чему је добијено шеснаест имино деривата амида циметне и супституисаних циметних киселина и то: деривата циметне (**CimTCH<sub>2fp</sub>**, **CimTCH<sub>sal</sub>**, **CimTCH<sub>8OH2qu</sub>** и **CimTCH<sub>2ap</sub>**), 3-хлорциметне (**3-ClCimTCH<sub>2fp</sub>**, **3-ClCimTCH<sub>sal</sub>**, **3-ClCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** и **3-ClCimTCH<sub>2ap</sub>**), 4-хлорциметне (**4-ClCimTCH<sub>2fp</sub>**, **4-ClCimTCH<sub>sal</sub>**, **4-ClCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** и **4-ClCimTCH<sub>2ap</sub>**) и 4-метоксициметне киселине (**4-MeOCimTCH<sub>2fp</sub>**, **4-MeOCimTCH<sub>sal</sub>**, **4-MeOCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** и **4-MeOCimTCH<sub>2ap</sub>**).

Осам једињења је синтетисано у једноставном поступку реакцијом **m-TCH** са циметним киселинама коришћењем средства за купловање 1-[bis(диметиламино)метилен]-1*H*-1,2,3-триазол[4,5-*b*]пиридинијум-3-оксид-хексафлуорфосфата (НАТУ). Применом наведене методе купловања помоћу НАТУ синтетисани су по два амида ферулне и кафеке киселине са **m-TCH<sub>2fp</sub>** и **m-TCH<sub>sal</sub>** при чему су добијени амиди ферулне, **FerTCH<sub>2fp</sub>** и **FerTCH<sub>sal</sub>**, и амиди кафеке киселине, **CafTCH<sub>2fp</sub>** и **CafTCH<sub>sal</sub>**. Такође, применом исте методе синтетисана су и четири амида на бази 3-хидроксициметне киселине, и то: **3-OHCimTCH<sub>2fp</sub>**, **3-OHCimTCH<sub>sal</sub>**, **3-OHCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** и **3-OHCimTCH<sub>2ap</sub>**. Наведени

амиди на бази ферулне, кафене и 3-хидроксициметне киселине су синтетисани у циљу анализе ефеката супституената на антиоксидативни потенцијал испитиваних једињења. Приказане су методе коришћене за карактеризацију синтетисаних једињења одређивањем температуре топљења, применом елементалне анализе, инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR), нуклеарне магнетне резонанционе спектроскопије (енгл. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) и то:  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR, 2D NMR технике (COSY, NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) и ултраљубичасте-видљиве спектроскопије (енгл. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*, UV-Vis).

У оквиру овог дела приказане су методе експерименталног одређивања биолошких активности синтетисаних једињења и то: антиоксидативне, антиканцер и антимикробне. Антиоксидативна активност је одређена применом четири *in vitro* методе: DPPH $^{\bullet}$  (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил-радикал), ABTS $^{2+}$  (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина), CUPRAC (смањење антиоксидативног капацитета бакарног јона) и TAC (укупни антиоксидативни капацитет).

Способност синтетисаних једињења из серија амида на бази циметне, 3-хлорциметне и 4-хлорциметне киселине да на испитиваним малигним ћелијским културама изазову ћелијску смрт методом двоцветног бојења Калцеином AM и пропидијум-јодидом и испитивање антимигранторне активности изведена је на Селиго цитометру (Celigo $^{\text{®}}$  imaging cytometer, Nexcelom Bioscience LLC, USA). Бојење ћелија Анексином V и пропидијум-јодидом, одређивање активације каспазе 8 и/или 9 у третираним ћелијама, као и одређивање присуства супероксидних радикала у митохондријама рађене су на проточном цитометру (Guava $^{\text{®}}$  easyCyte) користећи InCyte софтверски пакет (GuavaSoft softverski paket). Анализа свих експерименталних резултата рађена је у GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) софтверском пакету. Такође, антимикуобактеријска активност је одређивана за иста једињења у микротитар плочама методом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-броид (MTT) есеја на три соја *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) изолована из клиничких узорака.

Антибактеријска активност је одређена методом разблаживања у микротитар плочама са 96 бунарчића (Sarstedt, Nümbrecht, Немачка) на бактеријама. Приказана је метода одређивања антибактеријска активности према сојевима *Enterococcus cloacae* ATCC13047, *Staphylococcus aureus* NCTC 6571, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662, и *Escherichia coli* ATCC 1175. Наведена испитивања су спроведена на серији амида циметне киселине, **CimTCH $_{2\text{fp}}$** , **CimTCH $_{\text{sal}}$** , **CimTCH $_{8\text{OH}2\text{qu}}$**  и **CimTCH $_{2\text{ap}}$** , и амида супституисаних циметних киселина (**4-CiCim** и **4-MeOCim**), које имају исте супституенте у имино остатку молекула као наведена серија амида циметне киселине. Након тога за исте серије једињења, описан је поступак одређивања константи стабилности амида циметне киселине, у односу на способност компелксирања јона  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  применом UV-Vis методе. Такође, у оквиру овог поглавља приказане су методе оптимизације геометрије молекула применом теорије функционала густине (енгл. *Density Functional Theory*, DFT) коришћењем B3LYP функционала и 6-311++G(d,p) основног сета. Додатно, приказане су методе DFT прорачуна и QSAR молекулског моделовања примењене у циљу успостављања везе између структуре серија амида на бази циметне, 3-хлорциметне, 4-хлорциметне и 4-метоксициметне киселине и антибактеријске активности.

**Резултати и дискусија** садрже приказ и анализу добијених резултата синтезе и карактеризације имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина. Дати су резултати добијених проучавањем изомеризације и стања таутомерне равнотеже четири **m-TCH** и **b-TCH** једињења помоћу UV-Vis и NMR метода. У оквиру овог поглавља приказан је утицај структуре **m-TCH** и **b-TCH**, изомеризације и тион/тиол таутомеризације у смеши диметил-сулфоксида и воде на промену антиоксидативне активности коришћењем UV-Vis и NMR спектроскопских техника, а закључци су поткрепљени квантно-хемијским прорачунима. Испитан је механизам изомеризације након додавања воде у раствор диметил-сулфоксида. Анализом експерименталних резултата проучавања изомеризације и стања таутомерне равнотеже **m-TCH<sub>sal</sub>**, **m-TCH<sub>2ap</sub>**, **b-TCH<sub>sal</sub>** и **b-TCH<sub>2ap</sub>** једињења добијене су информације о структури синтетисаних једињења у раствору, као и о промени антиоксидативне активности узроковане наведеним процесима. Такође, анализом 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) и 2D NMR спектра, проучавана је конформација амида циметних киселина.

У овом делу дисертације детаљно су представљени и резултати испитивања антиканцер активности деривата амида циметне, 3-хлорциметне и 4-хлорциметне киселине на хуманим малигним ћелијским културама. Најпре је тестирана способност одабраних амида циметних киселина да изазову ћелијску смрт током 24 сата третмана серије хуманих малигнух култура: аденокарцинома дебелог црева (LoVo), аденокарцинома плућа (A549), аденокарцинома јајника (SkOV-3), аденокарцинома дојке (MCF-7) и аденокарцинома панкреаса (AsPC-1). Додатна испитивања унутарћелијских промена насталих услед третмана испитиваним једињењима извршена су на ћелијској линији A549 на којој је током прелиминарног тестирања највећи број испитиваних једињења изазвао висок проценат ћелијске смрти. Ова анализа је обухватала: одређивање типа ћелијске смрти (апоптоза/некроза), промену по фазама ћелијске деобе, активацију спољашњег и/или унутрашњег каспазног пута, утврђивање способности једињења да иницирају формирање супероксид радикала на нивоу митохондрија, као и антимигрантни потенцијал, односно способност једињења да инхибирају миграње малигнух ћелија као једног од предуслова у процесу настајања метастаза. Осим наведеног, потенцијална токсичност, која је чест нежељени ефекат у терапији малигнух болести, испитивана је на културама хуманих хепатоцита (HepG-2) и хуманој линији кератиноцита коже (HaCaT), што је допринело бољем сагледавању профила њихове биолошке активности. Поред тога, анализиран је капацитет истих једињења да омета пролиферацију *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) као узročника туберкулозе.

Овај део дисертације такође је посвећен анализи експериментално добијених резултата одређивања антибактеријске активности деривата амида циметне киселине према бактеријама *E. cloacae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*. Антибактеријска активност једињења је дефинисана одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) која доводи до инхибиције раста и размножавања сојева третираних бактерија за 50% (МИК<sub>50</sub>), односно сојева третираних *Mtb* за 90 % (МИК<sub>90</sub>), у односу на нетретирану контролу. Затим је дискутована и приказана 3D-QSAR анализа антибактеријске активности једињења заснована на анализи структуре лигананда. Резултати показују да постоје три важна структурна фрагмента који доприносе активности: два хидрофобна ароматична прстена позиционирана на супротним крајевима деривата амида циметне киселине (остатак циметне киселине и пиридин/хинолински прстен из **m-TCH**) и амидна веза. Сам крај овог поглавља посвећен је рационализацији

механизма антибактеријске активности. Имајући у виду да раст и размножавање патогених микроорганизама у великој мери зависе од њихове способности да искористе гвожђе, било је интересантно испитати и способност синтетисаних једињења да хелирају јоне гвожђа ( $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ ) и на тај начин смањују његову доступност. Анализом експерименталних резултата показано је да једињења имају висок потенцијал да хелирају гвожђе и формирају стабилне комплексе, што може представљати значајну основу за даља испитивања и потпуно расветљавање механизма антимикуробног деловања ових једињења.

**Закључак** садржи сумиране резултате добијене у докторској дисертацији уз наглашавање постигнутог научног доприноса, као и могућих праваца даљих истраживања.

**Литература** обухвата радове из области истраживања цитиране у дисертацији и покрива све њене делове.

**Прилог** садржи додатне NMR спектре неких синтетисаних једињења описаних у делу **Резултати и дискусија**.

### 3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

#### 3.1. Савременост и оригиналност

Велики број биохемијски важних супстанци и лекова у својој структури садржи хетероциклични прстен, због чега проучавање структуре, својстава и активности хетероцикличних једињења заузима веома важно место у биомедицинским и технолошким истраживањима. Хетероциклична једињења су позната у медицинској хемији по антимикуробној и антиканцер активности. Стога је за предмет истраживања ове докторске дисертације обухватило дизајнирање и синтеза нових оригиналних структура имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина који у својим структурама садрже две фармакофоре са *N*-хетероароматичним/ароматичним прстеном, проучавање њихових физичко-хемијских карактеристика и тестирање биолошке активности у циљу процене њихове могуће применљивости за третмане малигних и инфективних болести. Како је позната биолошка активност моно- и дихидразона дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина, извршено је одређивање биолошке активности свих синтетисаних једињења одређивањем: антиоксидативне, антиканцер и антибактеријске активности.

Једињења која поседују тионске ( $\text{C}=\text{S}$ ) и фенолне групе су позната по својој антиоксидативној активности и стога су очекивано синтетисана једињења показала добру антиоксидативну активност. Један од предмета истраживања ове докторске дисертације односи се на проучавање параметара електронске структуре као што су: релативне стабилности *E/Z* изомера и тион/тиол таутомера, процеса изомеризације, енергије раскидања веза, и вредност спинске делокализације насталог радикала моно- и дихидразона дихидразида тиоугљене киселине, тј. **m-TCH** и **b-TCH** деривата. Наведена теоријска израчунавања су спроведена са циљем корелације са резултатима антиоксидативне активности добијене на основу DPPH' теста. Такође, испитиван је и утицај растварача на изомеризацију и антиоксидативну активност једињења прве серије једињења и утицај присуства различитих супституената на имино групи и ароматичном језгру циметних киселина на биолошку активност једињења друге серије. Израчунавањем

теоријских спектра дошло се од сазнања на који начин структурне модификације доводе до промена мерених физичко-хемијских својстава. Испитивањем утицаја растварача примећена је повећана активност уклањања радикала након додавања воде у раствор моно- и дихидразона дихидразида тиоугљене (**m-TCH** и **b-TCH**) у диметил-сулфоксиду. Комбинација резултата UV-Vis, NMR спектроскопије и квантно-хемијских прорачуна је значајно помогла при анализи и рационализацији експериментално добијених резултата једињења прве серије. С тим у вези, у овој дисертацији анализиран је утицај растварача и супституената и промена укупног наелектрисања у основном и побуђеном стању на основу прорачуна енергија граничних молекулских орбитала (HOMO/LUMO и  $E_{\text{gap}}$ ).

На основу резултата тестирања антиканцер активности, једињења **3-ClCimTCH<sub>sal</sub>** и **4-ClCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** су се издвојила као најпотентнији индуктори апоптозне смрти у култури неситноћелијског аденокарцинома плућа A549. Једињење **4-ClCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** је показало способност да изазове масовну продукцију митохондријалних супероксидних радикала у третираним A549 ћелијама, што је карактеристика која није уочена у узорцима подвргнутим **3-ClCimTCH<sub>sal</sub>**. Са друге стране, третман са једињењем **3-ClCimTCH<sub>sal</sub>** произвео је статистички значајну супресију ћелијске покретљивости, за разлику од третмана са **4-ClCimTCH<sub>8OH2qu</sub>**. Преломна тачка истраживања постигнута је резултатима цитотоксичне активности на НаСаТ и НерG-2 ћелијама, који су показали да једињење **4-ClCimTCH<sub>8OH2qu</sub>** има неповољан профил токсичности. На основу резултата ове студије, једињење **3-ClCimTCH<sub>sal</sub>** ће бити предмет накнадних детаљних испитивања механизма одговорних за његово антиканцер деловање.

Тестирање анти-*Mtb* активности је показало да је једињење **CimTCH<sub>8OH2qu</sub>** компетентно да постигне МИК<sub>90</sub> у свим третираним сојевима, чиме је надмашило активност изонијазида и рифампицина, два главна и најефикаснија антитуберкулотика прве линије. Поред тога, **CimTCH<sub>8OH2qu</sub>** није утицао на виталност НерG-2 ћелија што је од посебне вредности с обзиром да је хепатотоксичност ограничавајући нежељени ефекат третмана Изонијазидом. Спајањем две познате фармакофоре, циметне киселине/супституисаних циметних киселина и монохидразона дихидразида тиоугљене киселине (**m-TCH**) добијена су једињења која су показала добру антибактеријску активност, посебно према соју *A. baumannii*. 3D QSAR анализом утврђена је квантитативна веза између структуре серија амида на бази циметне, 4-хлорциметне и 4-метоксициметне киселине и антибактеријске активности, и идентификовани су структурни фрагменти који се могу употребити за дизајн једињења побољшаних својстава.

Иако тренутно доступна литература не расветљује у потпуности механизме одговорне за биолошку активност приказаних једињења, резултати ове дисертације дају значајан допринос у овој области. Испитивањем повезаности антиоксидативне, антимикробне и антиканцер активности са структуром синетисаних једињења дошло се до значајних сазнања о деловима молекула који су одговорни за њихову активност. Овим истраживањем утврдила се веза између структуре и активности ових једињења, као и утицај типа и положаја супституције на хетероароматичним прстеновима на антибактеријску активност. Технике молекулског моделовања су врло корисне за рационализацију и предвиђање физичко-хемијских својстава и биолошке активности чиме се олакшава процес открића, дизајна, развоја нових лекова и механизма њиховог деловања. На основу приказаних метода и резултата у овој докторској дисертацији, као и на основу детаљно прегледане литературе може се закључити да се истраживања у оквиру ове докторске дисертације уклапају у научне трендове и указују на значај и актуелност



проучаване проблематике. Мултидисциплинаран приступ овог истраживања омогућио је да се у склопу двадесет и осам новосинтетисаних једињења идентификују молекули са значајном антибактеријском, анти-*Mtb* и антиканцерском активношћу, те истовремено повољнијим токсиколошким профилима у односу на тренутно доступне терапијске опције.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације цитирана су укупно 273 литературна навода. Већина цитираних радова представља научне радове објављене у врхунским међународним часописима која указују на актуелност истраживања у испитиваној области. Цитирани радови су публиковани у последње две деценије и представљају радове са тематиком значајном за израду ове докторске дисертације. Истраживања приказана у наведеним референцама су коришћена за планирање експерименталног рада, анализу и тумачење резултата добијених током израде докторске дисертације као и извођење закључака. Прегледана обимна литература и приказани резултати у објављеним радовима кандидата указују на адекватно познавање предметне области истраживања од стране кандидата.

### 3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Састав свих новосинтетисаних једињења је одређен елементалном анализом. Карактеризација је урађена применом спектроскопских метода: IR, UV-Vis и NMR спектроскопије ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , и 2D NMR технике).

Квантно-механичка оптимизација геометрије испитиваних једињења извршена је DFT методом, користећи B3LYP функционал и Def2TZVP базис сет, комбинацију WB97XD функционала и 6-311G(d,p) базис сета, или применом *ab initio* метода као што је MP2. Теоријски UV-Vis спектри испитиваних једињења су израчунати применом методе теорије функционала густине у зависности од времена (енгл. *Time Dependent Density Functional Theory*, TD-DFT). Симулација апсорпционих спектра помоћу TD-DFT метода је изведена у имплицитном моделу растварача (диметил-сулфоксид), користећи CAM-B3LYP функционал. Утицај солватације је тумачен комбинацијом различитих спектроскопских техника (UV-Vis и NMR) и кванто-хемијских прорачуна који су пружили нова сазнања о утицају изомеризације једињења у раствору на антиоксидативну активност. Сви кванто-хемијски прорачуни су изведени уз коришћење Gaussian09 програма. Израчунавања поља молекулских интеракција и њихова корелација са биолошким активностима урађена је у програму Pentacle 1.06.

За одређивање антиоксидативне активности једињења примењене су следеће спектрофотометријске *in vitro* методе: DPPH $^{\bullet}$ , ABTS $^{\bullet+}$ , CUPRAC и TAC. Веза између структуре и реактивности испитиваних једињења у антиоксидативним тестовима проучавана је са становишта стабилности генерисаних радикала и израчунавањем вредности енергије дисоцијације везе (енгл. *Bond Dissociation Energy*, BDE). Успешност примењених метода је анализирана поређењем експерименталних резултата и израчунатих вредности структуре и својстава испитиваних једињења.

Антиканцер активност и токсичност на моделима коже и јетре тестирана је применом специфичних флуоресцентних маркера и анализом третираних и нетретираних ћелија (негативна контрола) на проточном и имидинг цитометрима.

Потенцијална антибактеријска активност једињења је испитана методом разблаживања припремом серије разблажења тестираних једињења која су додавана у бактеријске културе. Раст бактерија је праћен мерењем оптичке густине и одређене су минималне концентрације једињења које су довеле до инхибиције раста и размножавања 50% популације бактерија у односу на нетретирану контролу (МИК<sub>50</sub>). Однос између структуре и антибактеријске активности једињења проучаван је применом 3D QSAR технике молекулског моделовања.

Анти-*Mtb* активност је детерминисана након 6 дана третмана сојева са испитиваним једињењима колориметријском МТТ методом, а дефинисана је као најнижа концентрација способна да редукује преживљавање бацила за 90% и више (МИК<sub>90</sub>). Методологија примењена за одређивање способности једињења да инхибирају раст и размножавање *Mtb* је по први пут примењена у склопу научних испитивања на националном нивоу. Такође, чињеница да је испитивање анти-*Mtb* активности рађено на изолованим клиничким сојевима даје посебан значај у аутентичности добијених резултата.

### 3.4. Применљивост остварених резултата

На основу добијених резултата у оквиру ове докторске дисертације може се закључити да је остварен значајан научни допринос у области органске синтезе и дефинисања структурних елемената одговорних за потенцијалну биолошку активност. Поред наведеног, повезивање квантно-хемијских прорачуна са експериментално добијеним подацима је значајно допринело бољем разумевању механизма њиховог деловања као биолошки активних молекула. Познавањем механизма дејства, значајно се олакшава процес открића, дизајна и развоја нових лекова.

### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Мохамед Х. Асалех је током израде докторске дисертације показао стручност и способност у припреми и реализацији експеримената, као и коришћењу различитих техника карактеризације и анализи добијених резултата. Комисија сматра да кандидат Мохамед Х. Асалеха квалитетом остварених научних резултата, као и својим ангажовањем у научно-истраживачком раду током израде ове докторске дисертације, поседује све квалитете неопходне за самосталан научно-истраживачки рад.

## **4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС**

### 4.1. Приказ остварених научних доприноса

Резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације су:

- нови имино деривати дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина који поседују антимикуробно и антиканцер дејство, а који такође показују и изражену антиоксидативну активност,
- допринос испитивању својстава деривата имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина,

- допринос сазнањима о утицају растварача на структуру молекула у раствору и утицају изомеризације на антиоксидативна својства испитиваних једињења,
- доказ различитих биолошких дејстава ових једињења и разјашњење механизма њиховог дејства утврђивањем везе између структуре и активности,
- могућност утврђивања туморских локалитета на којима се може очекивати потенцијална корист од терапијске примене,
- информације о унутарћелијским променама које би указале на механизам антиканцерског дејства једињења,
- публикације у истакнутим међународним часописима.

#### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Значајан научни допринос је остварен у синтези нових имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина; први пут је урађена испитивање њихове антиоксидативне, антимицробне и антиканцерске активности, као и испитивање њиховог механизма дејства. Такође, увидом у доступну литературу и на основу добијених резултата, може се закључити да приказана истраживања у овој докторској дисертацији представљају унапређење научних знања и пружају могућност за наставак детаљнијих истраживања у оквиру потврђеног спектра њихових биолошких активности.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Рад у истакнутом међународном часопису (M22):

- 1. Assaleh M. H., Jeremić S., Cvijetić I., Marinković A., Prlainović N.:** *In vitro* activity of novel cinnamic acids hydrazides against clinically important pathogens – *Journal of Molecular Structure, In Press*, vol. 1262, pp. 133016 (1-11), 2022 (IF(2020)=**3,196**) (ISSN: 0022-2860) (<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133016>).
- 2. Assaleh M. H., Bjelogrić S. K., Prlainović N., Cvijetić I., Božić A., Arandjelović I., Vuković D., Marinković A.:** Antimycobacterial and anticancer activity of newly designed cinnamic acid hydrazides with favorable toxicity profile: Antimycobacterial and anticancer activity of newly designed cinnamic acid - *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 15, no. 1, pp. 103532 (1-18), 2021 (IF(2020)=**5,165**) (ISSN: 1878-5352) (<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103532>).
- 3. Assaleh M. H., Božić A.R., Bjelogrić S., Milošević M., Simić M., Marinković A. D., Cvijetić I. N.:** Water-induced isomerism of salicylaldehyde and 2-acetylpyridine mono- and bis-(thiocarbohydrazones) improves the antioxidant activity: spectroscopic and DFT study - *Structural Chemistry*, vol. 30, no. 6, pp. 2447–2457, 2019 (IF(2019)=**2,081**) (ISSN: 1040-0400) (<https://doi.org/10.1007/s11224-019-01371-4>).

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33):

1. **Assaleh M. H., Božić A., Prlainović N., Milošević M., Stojiljković I., Cvijetić I., Marinković A.:** Synthesis, characterization, and antioxidant activity of novel 4-chlorocinnamamide monothiocarbohydrazones, *13<sup>th</sup> International Symposium Novel Technologies and Economic Development*, Leskovac, Republic of Serbia, 2019, pp. 41-50 (ISBN: 978-86-89429-36-7).

## 5. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације кандидата Мохамеда Х. Асалеха (Mohamed H. Assaleh) под називом „**ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)**“. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 13.03.2022. Утврђени проценат подударности је 23%. Овај проценат је последица општих места, односно употребе стручних термина и података који се тичу обрађене теме, назива коришћених метода и њихових скраћеница, личних имена, цитиране литературе, биографије и изјава кандидата. Део подударности се односи на претходно публиковане резултате докторандових истраживања који су проистекли из његове дисертације.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## 6. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега изложеног, Комисија сматра да је докторска дисертација Мохамеда Х. Асалеха (Mohamed H. Assaleh) под насловом „**ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)**“ научно заснована и представља оригинални научни допринос у области хемијских наука, што је потврђено и објављивањем радова у истакнутим међународним часописима и презентовањем на конференцијама. Резултати ових истраживања дали су допринос у развоју нових потенцијално биолошки активних једињења на бази имино деривата дихидразида тиоугљене и амида циметних киселина. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Хемијске науке, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Докторска дисертација је написана на Енглеском језику. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, да се докторска дисертација под називом „**ИМИНО ДЕРИВАТИ ДИХИДРАЗИДА ТИОУГЉЕНЕ И АМИДА**

**ЦИМЕТНИХ КИСЕЛИНА: КОРЕЛАЦИЈЕ СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ (IMINO DERIVATIVES OF CARBONOTHIOIC DIHYDRAZIDES AND CINNAMIC ACIDS AMIDES: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES)**“ кандидата Мохамеда Х. Асалеха (Mohamed H. Assaleh) прихвати, изложи на увид јавности и упути на коначно усвајање Већу научних области природних наука Универзитета у Београду.

Београд, 18.04.2022. године

#### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

	др Александар Маринковић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет
	др сц. мед. Снежана Бјелогрлић, виши научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије
	др Невена Прлаиновић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет  др Душан Мијин, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко–металуршки факултет
	др Ирена Аранђеловић, доцент Универзитета у Београду, Медицински факултет