

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовано комисију Комисију именовало Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, на својој 18. седници, одржаној 20. фебруара 2014. године.</p> <p>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:</p> <p>1. Др Евгенија Ђурендић, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 30.10.2002., Природно-математички факултет, Нови Сад, председник;</p> <p>2. Др Марија Сакач, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 08.11.2007., Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор;</p> <p>3. Др Катарина Пенев-Гаши, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 06.09.1993., Природно-математички факултет, Нови Сад, члан;</p> <p>4. Др Сузана Јовановић-Шанта, доцент, ужа научна област: Биохемија, изабрана у звање 07.03.2011., Природно-математички факултет, Нови Сад, члан;</p> <p>5. Др Соња Ђилас, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 13.08.1998., Технолошки факултет, Нови Сад, члан.</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Андреа, Радован, Николић</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 25.11.1979., Оџаци, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: -</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија -</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: Природно-математички факултет у Новом Саду; назив магистарске тезе: "Модификовани А- и Д-андростански деривати и њихова биолошка активност"; област: Органска хемија; датум одбране: 08.10.2008. године.</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: Хемија</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: "Синтеза нових стероидних једињења од потенцијалног биомедицинског значаја"
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл. Број поглавља: 9 (укључујући Прилог); Страница: 140 (28 страна поглавља Прилог, на CD-у); Слика: 91 (79 слика спектра у Прилогу, на CD-у); Табела: 6; Шема: 74; Референци: 175

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **Уводном** делу дисертације описан је значај стероидних хормона, њихов утицај на развој хормон-зависних обољења, као и значај 6-супституисаних стероидних деривата као биолошки активних једињења у третману бројних хормон зависних обољења. У овом делу су и дефинисани циљеви истраживања који подразумевају синтезу нових стероидних 16,17-секо-16,17а-динитрила са модификацијама у А и/или Б прстену стероидног језгра, као и испитивање њихове антипролиферативне активности *in vitro* према одабраним малигним ћелијским линијама.

У **Општем** делу дисертације дат је кратак приказ начина лечења тумора, са освртом на хормонску терапију и примену антиестрогена и инхибитора ароматазе у третману карцинома дојке. Такође је дат преглед синтеза 6-супституисаних стероидних деривата, Ексеместана – инхибитора ароматазе треће генерације, као и 6-оксо и 6-оксимино стероида. Обрађена релевантна литература је описана у четири одељка.

- Начини лечења тумора
 - Хормонска терапија
 - Хормонска терапија у лечењу карцинома дојке
 - Антиестрогени
 - Инхибитори ароматазе
- Синтезе Ексеместана
- Синтезе 6-оксо стероида
- Синтезе 6-оксимино стероида

Комисија констатује да је приказани литературни преглед свеобухватан и јасно презентован.

У одељку **Наши радови** детаљно су приказани и дискутовани резултати који се односе на добијање нових стероидних 16,17-секо-16,17а-динитрила, на испитивање антипролиферативне активности одабраних синтетизованих једињења према седам неопластичних и једној здравој ћелијској линији, као и корелациони односи између антипролиферативне активности и структуре синтетизованих једињења.

Синтезе 16,17-секо-16,17а-динитрила изведене су у андростанској и естранској серији:

- Синтезе 16,17-секо-16,17а-динитрила андростанске серије
 - Синтезе андростанских 16,17-секо-16,17а-динитрила са 4-ен-3-он, 1,4-диен-3-он или 1,4,6-триен-3-он системом
 - Синтезе андростанских 16,17-секо-16,17а-динитрила са 6-метилен-4-ен-3-он или 6-метилен-1,4-диен-3-он системом
 - Синтезе андростанских 16,17-секо-16,17а-динитрила са 4-ен-3,6-дион или 1,4-диен-3,6-дион системом
 - Синтезе андростанских 16,17-секо-16,17а-динитрила са 4-ен-3,6-дион 6-оксимино или 4-ен-3-он оксимо системом
 - Синтеза андростанског 16,17-секо-16,17а-динитрила са 4-хидрокси-4-ен-3-он системом
- Синтезе 16,17-секо-16,17а-динитрила естранске серије

Биолошка испитивања нових стероидних деривата су приказана у подпоглављу:

- Испитивање антипролиферативне активности

У **Експерименталном** делу дати су детаљни поступци добијања свих синтетизованих једињења, док су слике IR и NMR спектра новосинтетизованих једињења дате у **Прилогу** рада у електронској форми (CD).

У поглављу **Закључак** су сажето, јасно и прецизно дати резултати који се односе на делове „Наши радови“ и „Експериментални део“.

У одељку **Литература** су приказани литературни цитати, који су коришћени за писање „Увода“ и „Општег дела“, као и поглавља „Наши радови“. Све референце су наведене прецизно и прегледно.

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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

1. K. Penov Gaši, A. Oklješa, E. Petri, A. Ćelić, E. Djurendić, O. Klisurić, J. Csanadi, G. Batta, A. Nikolić, D. Jakimov, M. Sakač, Selective antitumour activity and ERA molecular docking studies of newly synthesized D-homo fused steroidal tetrazoles, *Med Chem Comm* **4**, 317, 2013. [IF 2,722; M22]

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У докторској дисертацији су описане синтезе нових андростанских и естранских 16,17-секо-16,17а-динитрила. Испитан је утицај одабраних новосинтетизованих једињења на пролиферацију седам ћелијских линија хуманих тумора.

У синтези 3 β -хидрокси-16,17-секоандрост-5-ен-16,17а-динитрила (**12**) као полазно једињење коришћен је 3 β -хидрокси-17-оксо-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил (**4**) који је добијен из дехидроепиандростерона (**1**). Дехидроепиандростерон (**1**) је реакцијом оксиминовања са *n*-амилнитритом у базној средини, дао 16-оксимино-кетон **2**, чијом је стереоспецифичном редукцијом са натријум-борхидридом добијен 17 β -хидрокси дериват **3**. *Beckmann*-овом фрагментацијом у Д-прстену једињења **3** добијено је једињење **4**. Синтеза циљног 16,17-секо-16,17а-динитрила (**12**) је урађена на два начина. Први начин обухватао је најпре заштиту хидроксилне групе у положају С-3 код једињења **4**, а затим редукцију насталог 3 β -ацетокси деривата **5**, при чему је добијен 3 β -ацетокси-17-хидрокси-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил (**6**). У циљу увођења цијано функције у молекул и добијања 3 β -ацетокси-16,17-секоандрост-5-ен-16,17а-динитрила (**10**), С-17 хидроксилна група једињења **6** је преведена у бољу одлазећу групу: тозилокси (једињење **7**), мезилокси (једињење **8**) и трифлуорометансулфонилокси (једињење **9**) групу. Једињења **7**, **8** и **9** су подвргнута реакцији супституције са калијум- или натријум-цијанидом, при чему је добијено једињење **10**. Једињење **8** је са натријум-цијанидом у диметилсулфооксиду дало и ди-(3 β -ацетокси-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил-17-ил)-етар (**11**). Уклањањем ацетокси заштите у једињењу **10** добијено је једињење **12**. Други синтетски пут добијања једињења **12** из једињења **4** обухватао је две синтетске фазе. У првој фази је једињење **4** преведено у хидразон **13** који је у реакцији са диетилалуминијум-цијанидом дао циљни производ **12**. Анализом добијених резултата закључено је да је први синтетски пут, иако дужи, повољнији, јер је укупан принос у односу на други синтетски пут значајно већи.

Oppenauer-овом оксидацијом 5-ен-3 β -ола **12**, која је изведена на два начина, добијен је 4-ен-3-он дериват **14**. Реакцијом дехидрогенације, која је изведена при различитим реакционим условима, из једињења **14** је добијен 1,4-диен-3-он дериват **15**. Из једињења **12** у реакцији са DDQ у диоксану добијен је 1,4,6-триен-3-он дериват **16**.

У једињење **14** је уведена метиленска група у положај С-6, при чему је добијен 6-метилен-3-оксо-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрил (**17**), који је реакцијом дехидрогенације дао 1,4-диен-3-он дериват **18**.

3,6-Диоксо-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрил (**19**) је добијен модификованом *Jones*-овом оксидацијом 5-ен-3 β -ола **12**. Променом реакционих услова настао је Б-секо дериват **20**. Дехидрогенацијом једињења **19** добијен је 1,4-диен-3,6-дион **21**.

За синтезу 16,17-секо-16,17а-динитрила са оксимино функцијом у положају С-6 употребљен је 3 β -ацетокси-5 α -хидрокси-6-оксо-16,17-секоандростан-16,17а-динитрил (**23**), који је добијен из једињења **10**, на два начина. Први начин се састојао из две синтетске фазе. У првој фази је оксидована двострука веза у једињењу **10** са *m*-хлорпербензоевом киселином, при чему је добијена смеша 5 α ,6 α - (**22a**) и 5 β ,6 β -епоксида (**22b**). Оксидацијом смеша једињења **22a** и **22b** са CrO₃

добијено је једињење **23** у високом приносу, док је променом реакционих услова као главни производ реакције добијена 5,6-секо-5-кето-6-киселина **24**. Једињење **23** је добијено из једињења **10** и бржим и једноставнијим „one-pot“ поступком. Овај поступак је подразумевао добијање смеше епоксида **22a** и **22b**, која је, без претходног изоловања производа, подвргнута оксидацији са CrO_3 . Дехидратацијом једињења **23** добијен је 3 β -ацетокси-6-оксо-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрил (**25**), који је са хидрокси-амин-хидрохлоридом дао (6*E*)-хидроксиимино дериват **26**. Уклањањем ацетатне заштите код једињења **26** добијен је 3 β -хидрокси дериват **27**. У зависности од примењених реакционих услова, поред добијеног једињења **27**, добијен је и 6-кето дериват **28**. Оксидацијом хидроксилене групе у положају С-3 код једињења **27** добијен је (6*E*)-хидроксиимино-4-ен-3-он дериват **29**.

Полазећи од једињења **14** синтетизовани су и (3*E*)- и (3*Z*)-хидроксиимино-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрили (**30a** и **30b**).

У циљу добијања 4-хидрокси-4-ен-3-он система код андростанског 16,17-секо-16,17а-динитрила, 4-ен-3-он дериват **14** је подвргнут реакцији са водоник-пероксидом. Смеша 4 α ,5 α - и 4 β ,5 β -епокси деривата **31a** и **31b** је добијена на -14°C , док је на 4°C дошло и до парцијалне хидролизе С-16 нитрилне функције и настајања амида **32a** и **32b**. Отварање оксиранског прстена смеше епоксида **31a** и **31b** извршено је мрављом киселином, при чему је добијен 3-оксо-4-хидрокси-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрил (**33**).

За синтезу 16,17-секо-16,17а-динитрила естранске серије, као полазно једињење употребљен је 3-бензилокси-17-хидрокси-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил (**39**), који је добијен из естрона (**34**) у пет синтетских фаза. Најпре је фенолна хидроксилене група једињења **34** заштићена превођењем у бензилетарску функцију. Затим је бензилетар **35** подвргнут реакцији оксиминовања. Добијени оксимино-кетон **36** је редукован, при чему је настао 3-бензилокси-17 β -хидроксиестра-1,3,5(10)-триен-16-он оксим (**37**). *Beckmann*-овом фрагментацијом Д-прстена оксимино-алкохола **37** добијен је секоцијано-алдехид **38**, који је након редуције алдехидне групе дао алкохол **39**. Након мезиловања једињења **39**, једињење **40** је подвргнуто реакцији супституције мезилокси групе са натријум-цијанидом, при чему је добијен 3-бензилокси-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16,17а-динитрил (**41**). У завршној фази код једињења **41** је уклоњена бензилетарска заштита, при чему је добијен циљни 3-хидрокси-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16,17а-динитрил (**42**).

У раду је испитан утицај одабраних новосинтетизованих једињења на пролиферацију седам малигних (HeLa, MDA-MB-231, PC3, MCF-7, HT-29, K562 и A549) и једне нормалне ћелијске линије (MCR-5).

На основу добијених резултата закључено је да је чак осам од девет тестираних једињења показало јаку *in vitro* антипролиферативну активност према HeLa ћелијској линији, од којих су једињења **12**, **19**, **27** и **29** потентнија од референтног Форместана. Једињења **15**, **19**, **29** и **42** су испољила јаку цитотоксичну активност према малигним ћелијама MDA-MB-231 линије, док су снажну активност према PC3 ћелијској линији показала једињења **14**, **19**, **27** и **33**. Једињења **27** и **29** су показала значајну антипролиферативну активност према HT-29, а једињење **14** према MCF-7 ћелијској линији. Тестирана једињења нису утицала на пролиферацију малигних ћелија K562 и A549. Од великог је значаја и резултат да су новосинтетизована једињења нетоксична на здраве ћелије. Испитивањем утицаја супституената у положају С-4 и С-6 и присуства двоструких веза у А прстену на антипролиферативну активност закључено је да увођење Δ^1 двоструке везе и ароматизација А прстена доводе до повећања антипролиферативне активности само према MDA-MB-231 ћелијској линији, док присуство 4-ен-3-он система у молекулу повећава утицај на туморске ћелијске линије HeLa, PC3 и MCF-7. Увођење метиленске, кето или оксимино групе у положај С-6 код једињења **14** доводи до различитих промена у антипролиферативној активности. С-6 метиленска група (једињење **17**) утиче на потпуни губитак антипролиферативне активности, док присуство С-6 кето групе (једињење **19**) повећава антипролиферативну активност према MDA-MB-231 и у извесној мери према HeLa ћелијама. Присуство оксимино групе у истом положају (једињење **29**) повећава цитотоксичност према MDA-MB-231, HeLa и HT-29 ћелијама. Присуство хидроксилене групе у положају С-4 смањује антипролиферативну активност. Испитивањем утицаја Д-прстена на антипролиферативну активност закључено је да модификација Д-прстена, отварање и увођење нитрилних функција, доводи до повећања цитотоксичности према PC3, MDA-MB-231 и MCF-7 ћелијским линијама. Поређењем цитотоксичне активности једињења **19** и **29** закључено је да

присуство протон акцепторске кето групе у положају С-6 доприноси повећању цитотоксичности једино према РС3 ћелијској линији, док протон донорска оксимино група доводи до веће потентности према А459, НТ-29, HeLa и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Присуство 3β-хидроксилне групе у положају С-3 уместо кето групе код 6-кето деривата **19** (једињење **28**) доводи до повећања антипролиферативне активности само према НТ-29 ћелијској линији, док код 6-оксимино деривата **29** (једињење **27**) према HeLa и РС3 ћелијским линијама.

Закључци, који су у овој докторској дисертацији изведени из добијених резултата јасно одражавају значај и научни допринос спроведеног истраживања.

VIII ОСЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

На основу сагледавања постављених циљева ове докторске дисертације и изабраној литератури при изради дисертације, може се констатовати да се проблематици пришло на студиозан и свеобухватан начин.

Кандидаткиња је веома студиозно приступила обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичке целине. Резултати истраживања су јасно и систематично изложени и добро илустровани помоћу прегледних схема, слика и табела. У поглављима „Наши радови“ и „Експериментални део“ добијени резултати су адекватно представљени и дискутовани. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговоре на циљеве постављене у овој докторској дисертацији.

Кандидаткиња је успешно применила савремене методе органске синтезе, а такође је показала и добро познавање физичко-хемијских метода, које је користила за доказивање структуре новосинтетизованих једињења. Поред тога, показала је и добро разумевање приликом интерпретације биолошких тестова, тако да кандидаткиња има способност за интердисциплинарни приступ овој сложеној проблематици.

IX КОНАЧНА ОСЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

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

Комисија сматра да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног истраживања. У оквиру ове докторске дисертације синтетизовано је укупно 42 једињења. Одабраним новосинтетизованим једињењима је испитана антипролиферативна активност према седам туморских и једној здравој ћелијској линији. Поједина тестирана једињења су показала јачу антипролиферативну активност од комерцијалног лека Форместана. Део добијених резултата је публикован у раду категорије M22, што указује на квалитет и оригиналност ових истраживања. С обзиром на значај и важност истраживања у области синтезе лекова који се користе у третману хормон-зависних болести, резултати који су добијени у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан допринос у овој научној области.

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 укупне оцене дисертације, комисија предлаже:**

Да се прихвати позитивна оцена докторске дисертације под насловом "Синтеза нових стероидних једињења од потенцијалног биомедицинског значаја" и да се кандидату мр Андреи Николић одобри одбрана.

КОМИСИЈА

Др Евгенија Ђурендић
ред. проф. ПМФ-а у Новом Саду

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

Др Катарина Пенев-Гаши
ред. проф. ПМФ-а у Новом Саду

Др Сузана Јовановић-Шанта
доцент ПМФ-а у Новом Саду

Др Соња Ђилас, ред. проф.
Технолошког факултета у Новом Саду

У Новом Саду,
28.02.2014.