

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
кандидата Окљеша Александра

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију Комисију је именовало Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, на својој 35. седници, одржаној 28. априла 2015. 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 Јанош Чанади, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабран у звање 01.11.2004. год., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад, председник</p> <p>2. Др Катарина Пенев-Гаши, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 06.09.1993., Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор</p> <p>3. Др Евгенија Ђурендић, редовни професор у пензији, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 30.10.2002., Природно-математички факултет, Нови Сад; члан</p> <p>4. Др Марија Сакач, редовни професор, ужа научна област: Органска хемија, изабрана у звање 08.11.2007., 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: Александар, Миодраг, Окљеша</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 22.12.1985., Нови Сад, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: - Природно-математички факултет у Новом Саду; дипломирани хемичар-општи смер; студије уписао 2004. године, а завршио 2008. године; дипломирани хемичар.</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2008. година, Докторске академске студије, Хемија, ПМФ, Универзитет у Новом Саду</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
Синтеза и биолошка активност нових стероидних хетероцикличних једињења

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.

У овој докторској дисертацији испитане су 1,3-диполарне циклоадиционе реакције стероидних азидо-нитрила, нитрона и нитрил-оксида андростанске и естранске серије при чему су синтетизована различита хетероциклична стероидна једињења. Утврђене су структуре новосинтетизованих једињења и испитана је њихова биолошка активност.

Број поглавља: 9 (укључујући Прилог)/ Страна: 197 (53 страна поглавља Прилог)/ Слика: 103 (83 слика спектра у Прилогу)/Дијаграма: 2/ Табела: 5/ Шема: 97/Литературне референци: 156

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **Уводном** делу дисертације описан је значај стероидних хетероцикличних једињења као биолошки активних једињења у третману карцинома и других болести. У овом делу су дефинисани циљеви истраживања који подразумевају синтезу нових стероидних тетразола, изоксазолина, изоксазола и 17-аза-D-хомо-стероида, као и испитивање њихове антипролиферативне активности *in vitro* према одабраним малигним ћелијским линијама.

У **Општем** делу дисертације дат је детаљан преглед литературе у којој су описане методе добијања стероидних и нестероидних азида, нитрона и нитрил-оксида, као и њихове диполарне циклоадиције у одговарајућа хетероциклична једињења. Описана је и биолошка активност одабраних хетероцикличних једињења. Обрађена релевантна литература је описана у четири одељка: 1. Синтеза и циклоадиционе реакције азида; 2. Синтеза и реакције нитрона; 3. Синтеза и циклоадиционе реакције нитрил-оксида; 4. Биолошка активност одабраних хетероцикличних једињења. Комисија констатује да је приказани литературни преглед свеобухватно и јасно презентован.

У поглављу **Резултати и дискусија** детаљно су приказани и дискутовани резултати који се односе на синтезу нових стероидних хетероцикличних једињења; утврђивање њихове структуре, као и на испитивање биолошке активности одабраних синтетизованих једињења. Резултати су груписани у следећа три одељка: 1. Синтеза андростанских и естранских D-хомо тетразола 1,3-диполарном циклоадицијом *in situ* генерисаних 17-азидо-16-нитрила. Синтеза андростанских и естранских D-хомо тетразола; 2. Синтеза D-секо и D-хомо стероидних хетероцикличних једињења андростанске и естранске серије (синтеза D-секо андростанског изоксазола 1,3-диполарном циклоадицијом *in situ* генерисаног нитрил-оксида и алкина, синтеза 17-аза-D-хомо андростанских и естранских хетероцикличних деривата, синтеза D-секо андростанских и естранских изоксазолина 1,3-диполарном циклоадицијом нитрона и алкина); 3. Испитивање биолошке активности синтетизованих једињења (*in vitro* антитуморски потенцијал D-хомо синтетизованих стероидних D-хомо тетразола, испитивање антипролиферативне активности D-секо једињења, корелација између антипролиферативне активности и структуре синтетизованих једињења, испитивање способности стероидних тетразола и D-секо једињења да индукују апоптозу и мењају ћелијски циклус туморских ћелија).

У **Експерименталном** делу дати су јасни и детаљни поступци добијања свих синтетизованих једињења.

У поглављу **Закључак** су сажето и јасно дати резултати који су постигнути током израде ове докторске дисертације.

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

У поглављу **Прилог** се налазе скениране слике IR, ^1H и ^{13}C NMR спектра 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

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. Čelić, E. Djurendić, O. Klisurić, J. Csanadi, G. Batta, A.

Nikolić, D. Jakimov, M. Sakač, Selective antitumour activity and ERα molecular docking studies of newly synthesized D-homo fused steroidal tetrazoles, *Med Chem Comm* **4**, 317-323, 2013. **(M22)**

2. **Oklješa, A. M.**; Jovanović-Šanta, S. S.; Klisurić, O. R.; Sakač, M. N.; Djurendić, E. A.; Jakimov, D. S.; Aleksić, L. D.; Penov Gaši, K. M.; Structural analysis and antitumor activity of androstane D-seco-mesyloxy derivatives, *J. Braz. Chem. Soc.*, **24**, 1613-1622, 2013. **(M22)**

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У првом делу ове дисертације остварена је "click" синтеза андростанских и естранских D-хомо кондензованих пентацикличних тетразола **8**, **16**, **26** и **33** интрамолекулском 1,3-диполарном циклоадицијом *in situ* генерисаних 17-азидо-16-нитрила, у присуству или без присуства бакар(I)-хлорида. Трансестерификацијом или хидрогенолизом поменутих тетразола добијени су одговарајући тетразоли **9**, **18**, **27** и **34** са слободном хидроксилном групом у положају C-3.

Као полазно једињење за синтезу пентацикличног D-хомо тетразола **8** послужио је мезилат **7** који је добијен у шест синтетских фаза полазећи од дехидроепиандростерона (**1**). У реакцији мезилата **7** и натријум-азида 1,3-диполарном циклоадицијом *in situ* генерисаног D-секо-азидо-нитрила **7a** настао је тетразол **8**. Конвенционалним загревањем реакционе смеше тетразол **8** је добијен у приносу од 81 %, а микроталасним озрачивањем је добијен у приносу од 93%. Структура тетразола **8** је потврђена рентгено-структурном анализом. Синтеза тетразола **8** представља нови пример интрамолекулске "click" реакције без катализатора. Уклањањем заштитне функције у тетразолу **8** добијен је тетразол **9** са 3 β -хидроксилном групом. Синтеза андростанских D-хомо-(17 $\alpha\beta$)-метил тетразола **16** и **18** почиње стереоспецифичном адицијом метилмагнезијум-јодида на 17-кето групу 16-оксима **2**, при чему настаје 17 α -метил-16,17-секо-16-нитрил **11**. Редуkcијом 17-кето деривата **11** са натријум-борхидридом добијена је смеша D-секо-цијано алкохола **12** и **13**. Смеша алкохола **12** и **13** подвргнута је реакцији мезиловања са метансулфонил-хлоридом, при чему су добијени мезилати **14** и **15** који су успешно раздвојени хроматографијом на силика-гелу. Рентгено-структурном анализом утврђена је 17S-конфигурација мезилата **14** и 17R-конфигурација његовог еписмера **15**. Конвенционалним загревањем смеше мезилата **14** и **15** са натријум-азидом у хексаметилфосфорамиду (НМРА), као растварачу, у присуству бакар(I)-хлорида добијен је тетразол **16**. ¹H-NOE NMR експериментом је одређена 17 $\alpha\beta$ -конфигурација једињења **16**. Добијање тетразола **16** представља нови пример "click" синтезе тетразола у присуству бакар(I)-хлорида. Конвенционалним загревањем смеше мезилата **14** и **15** са натријум-азидом у DMSO добијени су тетразол **16** и елиминациони производ, алкен **17**. Међутим, микроталасним озрачивањем смеше мезилата **14** и **15** у НМРА добијени су већи приноси тетразола **16** и алкена **17**. Одстрањивањем ацетатне заштите код тетразола **16** добијен је 3 β -хидрокси дериват **18**.

Поред андростанских D-хомо-D-кондезованих тетразола, синтетизовани су одговарајући тетразоли у естранској серији. Мезилат **25**, који је добијен у шест синтетских фаза полазећи од естрона (**19**), послужио је као полазно једињење у синтези тетразола **26** и **27**. Конвенционалним загревањем мезилата **25** са натријум-азидом добијен је тетразол **26** у интрамолекулској "click" реакцији без катализатора *in situ* генерисног азидо-нитрила **25a**, а микроталасним озрачивањем исти производ је добијен у мало већем приносу. Хидрогенолизом једињења **26** добијен је тетразол **27**.

Мезилат **31**, који је претходно добијен у вишефазној синтези полазећи од естрона, послужио је као директан прекурсор за синтезу естранских D-хомо тетразола са 17 $\alpha\beta$ -метил групом **33** и **34**. Испитани су различити реакциони услови у циљу добијања тетразола **33** у што већем приносу. Највећи принос тетразола **33** постигнут је конвенционалним загревањем мезилата **31** са натријум-азидом у присуству бакар(I)-хлорида у НМРА на 145 °C, при чему је добијен искључиво тетразол **33**. Конвенционалним загревањем мезилата **31** са натријум-азидом у НМРА добијен је тетразол **33** и алкен **32**. Микроталасним озрачивањем смеше мезилата **31** и натријум-азидом у НМРА добијени су тетразол **33** и елиминациони производ **32** у укупно већем приносу. Добијање тетразола **33** представља нови пример "click" синтезе тетразола у присуству или без присуства бакар(I)-хлорида. У завршној фази са тетразола **33** је уклоњена бензилетарска заштита и добијен тетразол **34**.

У другом делу ове докторске дисертације остварена је синтеза нових стероидних D-секо оксима, нитрона и нитрил-оксида који су послужили као прекурсори у синтези D-секо и D-хомо хетероцикличних стероидних деривата. Полазна једињења у овом делу докторске дисертације били су D-секо-цијано алдехиди андростанске и естранске серије, **4** и **23**, који су добијени вишефазним хемијским трансформацијама дехидроепиандростерона и естрона. Полазећи од андростанског алдехида **4** и хидроксиламина синтетисан је интермедијерни оксим **35**, који је са хлорамин-Т трихидратом *in situ* наградио нитрил-оксида **36**. Стероидни D-секо изоксазол **37** је настао у "one pot" региоселективној бакар(I)-катализованом 1,3-диполарној циклоадиционој реакцији андростанског D-секо нитрил-оксида **36** и фенилацетилена. У овој докторској дисертацији успешно је остварена

синтеза четири D-хомо-17-аза стероидна деривата андростанске и естранске серије **38**, **39**, **41** и **42**. Хетероциклична стероидна једињења **38** и **39** добијена су загревањем алдехида **4** са хидроксиламином у метанолу, односно у води као растварачу. Структура D-хомо-17-аза-16,17а-бис(хидроксиимино) деривата **39** доказана је рентгено-структурном анализом. Помоћу HMBC NMR експеримента утврђени су положаји 16-оксо и 17а оксимино група у једињењу **38**. Алдехид **23** послужио је као полазно једињење у синтези оксима естранске серије **40**. Из естранског алдехида **23** и хидроксиламина су добијени 17-аза-D-хомо деривати **41** и **42**. Стероидни D-секо нитрони андростанске и естранске серије **43**, **46**, **49** и **51**, који су добијени из одговарајућих алдехида **4** и **23**, послужили су као директни прекурсори за синтезу стероидних D-секо изоксазолина **44**, **45**, **47**, **48**, **50**, **52** и **53**. *N*-Метил нитрон **43** добијен је у реакцији алдехида **4** и *N*-метилхидроксиламина. У наредној фази нитрон **43** је у реакцији 1,3-диполарне циклоадиције са диметил-ацетиленидикарбоксилатом (DMAD) дао смешу изоксазолина **44** и **45**. У реакцији алдехида **4** и *N*-бензилхидроксиламина настао је *N*-бензил нитрон **46** који је са DMAD дао изоксазолине **47** и **48**. Естрански алдехид **23** је у реакцији са *N*-метилхидроксиламином дао нитрон **49**. У следећем кораку *N*-метил нитрон **49** је 1,3-диполарном циклоадицијом са DMAD дао изоксазолин **50**. *N*-Бензил нитрон **51** је синтетисан из алдехида **23** и *N*-бензилхидроксиламина. У реакцији нитрона **51** са DMAD добијена је смеша изоксазолина **52** и **53**.

У трећем делу рада испитана је биолошка активност синтетизованих једињења. Наиме, проучаван је утицај одабраних једињења на пролиферацију шест ћелијских линија хуманих тумора (MCF-7, MDA-MB-231, PC3, HeLa, K562 и HT-29), док је као контрола служила здрава хумана ћелијска линија (MRC-5). Тетразоли **18** и **33** су испољили снажну и селективну антипролиферативну активност према MCF-7 ћелијама аденокарцинома дојке (ER+). Естрански тетразол **26** је цитотоксичан једино према MCF-7 (ER+) аденокарциному дојке, показујући високу селективност. D-Секо-мезилокси деривати **14** и **15** су се показали као најпотентнији антипролиферативни агенси према MDA-MB-231 ћелијама аденокарцинома дојке (ER-). Једињења **14** и **15** показују 16- и 8-пута (респективно) већу антипролиферативну активност према PC-3 ћелијама карцинома простате него доксорубин. Најпотентнији инхибитор раста K562 ћелија хроничне мијелоидне леукемије је андростански тетразол **16**. Важно је истаћи да сва испитивана једињења не показују цитотоксичност према здравим MRC-5 ћелијама. На основу SAR анализе може се закључити да је присуство C-17а метил групе у молекулима андростанских тетразола повезано са већом антипролиферативном активношћу према већини третираних ћелијских линија. Присуство метил групе у положају C-17а естранског тетразола **33** повећава његову активност према MCF-7 и HT-29 ћелијским линијама. Бензилокси функција у положају C-3 естранских тетразола повезана је са повећањем активности према ћелијској линији MCF-7, као и према HT-29 у случају једињења **33**, односно PC-3 ћелијској линији код једињења **26**. Присуство ацетокси групе у положају C-3 у андростанским D-хомо тетразолима **8** и **16** повећава антипролиферативну активност према ћелијским линијама K-562 и PC-3, као и према MDA-MB-231 ћелијској линији код једињења **16**. Поређењем цитотоксичности D-секо-цијано-алкохола **12** са цитотоксичношћу мезилокси деривата **14** и **15**, може се закључити да присуство мезилокси функције у положају C-17, без обзира на конфигурацију, повећава антипролиферативну активност према свим испитиваним туморским ћелијским линијама.

У циљу утврђивања механизма смањања пролиферације туморских ћелија испитане су морфолошке промене услед апоптозе ћелија и анализирана је расподела ћелија по фазама ћелијског циклуса најсензитивније ћелијске линије, при чему су најбоље резултате показали тетразол **26** и мезилокси дериват **15**.

VIII ОЦЕНА 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. Кандидат је веома студиозно приступио обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичне целине. Резултати истраживања су јасно, прегледно и систематично изложени и добро илустровани помоћу прегледних схема, слика и табела. У поглављима „Резултати и дискусија“ 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. Кандидат је успешно применио савремене методе органске синтезе, а такође је показао и добро познавање физичко-хемијских метода, које је користио за доказивање структуре новосинтетизованих једињења. Поред тога, показао је и добро разумевање приликом интерпретације биолошких тестова, тако да кандидат има способност за интердисциплинарни приступ овој сложеној проблематици.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА 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. С обзиром да је у литератури познат релативно мали број примера "click" синтезе хетероцикличних стероидних једињења, ова дисертација представља допринос овој новој области хемије. У оквиру ове докторске дисертације синтетизовано је неколико десетина нових једињења која су окарактерисана савременим спектроскопским методама и рентгенском структурном анализом. Одабраним новосинтетизованим једињењима је испитана антипролиферативна активност према шест туморских и једној здравој ћелијској линији. Испитана је способност синтетизованих једињења да индукују апоптозу и мењају ћелијски циклус туморских ћелија. Део добијених резултата је публикован у 2 научна рада у истакнутим међународним часописима (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 карцинома и других 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 и биолошка активност нових стероидних хетероцикличних једињења " и да се кандидату дипломираном хемичару, Окљеша Александру одобри одбрана.

Нови Сад, 28.05.2015.

КОМИСИЈА

Др Јанош Чанади
ред. проф. ПМФ-а у Новом Саду

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

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

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

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