

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Срђана Бједова

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовало комисију Комисију именовало Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, на својој 23. седници, одржаној 15.12.2016. 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> <ul style="list-style-type: none">• Др Јанош Чанади, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора у звање: 01.11.2004., Природно-математички факултет, Нови Сад, председник• Др Марија Сакач, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора 08.11.2007., Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор• Др Мирјана Попсавин, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора у звање: 01.01.2003., Природно-математички факултет, Нови Сад, члан• Др Сениша Марков, редовни професор, ужа научна област Биотехнологија, датум избора у звање: 15.10.2012., Технолошки факултет, Нови Сад, члан• Др Михаљ Поша, ванредни професор, ужа научна област Фармација (Хемија), датум избора у звање: 24.10.2013., Медицински факултет, Нови Сад, члан
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Срђан, Иван, Бједов</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 04.09.1984., Нови Сад, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Природно-математички факултет, Хемија, Дипломирани хемичар</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2011. године, Докторске студије хемије</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:</p>

<p>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</p> <p>Синтеза и биолошка испитивања нових деривата жучних киселина</p>
<p>IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.</p> <p>Докторска дисертација „Синтеза и биолошка испитивања нових деривата жучних киселина“ садржи 10 поглавља: Увод (2 стране), Општи део (29 страна), Наши радови (37 страна), Експериментални део (28 страна), Закључак (4 стране), Summary (3 стране), Скраћенице (1 страна), Литература (11 страна), Биографија (1 страна), као и поглавље Прилог (62 стране). Укупан број страна текста је 116 плус 62 стране поглавља Прилог, на CD-у. Слика: 120 (115 слика НМР спектра у Прилогу). Табела: 4. Шема: 60. Референци: 229.</p>
<p>V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</p> <p>У поглављу <i>Увод</i> је концизно описан физиолошки значај и улога жучних киселина. Дата је и примена како природних жучних киселина, тако и синтетских деривата, као медикамената у третману различитих обољења. Јасно и прецизно су представљени циљеви истраживања обухваћени у дисертацији.</p> <p><i>Општи део:</i> У овом поглављу је дат детаљан преглед литературе која се односи на биолошку активност жучних киселина и њихових синтетских деривата, механизам деловања деривата жучних киселина, као и на синтезу одабраних биолошки активних алкил деривата жучних киселина. Приказани преглед литературе је дат јасно и прегледно.</p> <p><i>Наши радови:</i> Поглавље где су приказани и продискутовани резултати добијени у истраживању ове дисертације. Ово поглавље је подељено у следећа подпоглавља:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Синтеза оксо деривата жучних киселина • Синтеза оксазолинских деривата жучних киселина • Синтеза алкил деривата жучних киселина Грињаревом (Grignard-овом) реакцијом • Уклањање оксазолинске заштите и елиминација 7-хидроксилне групе код 7β-бутил и 7β-октил деривата холне киселине • Синтеза алкилиденских деривата жучних киселина у условима Витигове (Wittig-ове) реакције • Испитивање реактивности деривата жучних киселина у условима ХВЕ (HWE је скраћеница од Horner–Wadsworth–Emmons) реакција • Синтеза одабраних 24-амидних деривата жучних киселина • Хидрогенација одабраних деривата жучних киселина • Испитивање биолошке активности одабраних деривата жучних киселина <p>Резултати истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом су нови и оригинални, а проблематика је интересантна и актуелна.</p> <p><i>Експериментални део:</i> У овом делу рада су детаљно описани поступци синтезе интермедијера и финалних производа, као и потпуна карактеризација синтетизованих једињења (асигнације NMR, IR, M-спектра, као и тачке топљења за кристалне супстанце).</p> <p>У поглављу <i>Закључак</i> су јасно и прегледно изведени закључци из резултата приказаних у одељку Наши радови, а одговарајући закључци на енглеском језику су приказани у поглављу <i>Summary</i>.</p> <p><i>Прилог:</i> Овај део рада је дат у електронској форми (CD), а садржи скениране слике ¹H и ¹³C NMR спектра синтетизованих једињења што доприноси лакшем праћењу дела текста у одељку Наши радови, који се односи на тумачење спектроскопских доказа структуре синтетизованих једињења.</p>
<p>VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ</p>

1. M. Poša, **S. Bjedov**, D. Škorić, M. Sakač: „Micellization parameters (number average, aggregation number and critical micellar concentration) of bile salt 3 and 7 ethylidene derivatives: Role of the steroidal skeleton II“, *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, **2015**, 1850, 1345-1353. [IF 5.083; **M21**]
2. M. Poša, **S. Bjedov**, A. Sebenji, M. Sakač: „Wittig reaction (with ethylidene triphenylphosphorane) of oxo-hydroxy derivatives of 5 β -cholanolic acid: Hydrophobicity, haemolytic potential and capacity of derived ethylidene derivatives for solubilisation of cholesterol“, *Steroids*, **2014**, 86, 16-25. [IF 2.803; **M22**]
3. M. Poša, A. Sebenji, **S. Bjedov**, S. Obradović, V. Tepačević, M. Sakač: „Parameters of micellization and hydrophobicity of sodium salts of 7-butyl (butylidene) and 7-octyl (octylidene) derivatives of the cholic and the deoxycholic acid in a water solution: Pattern recognition — Linear hydrophobic congeneric groups“, *Journal of Molecular Liquids*, **2016**, 224, 9-18. [IF 2.740; **M22**]

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове докторске дисертације синтетизовани су алкил и алкилиден деривати жучних киселина (ЖК), како са карбоксилном, тако и са оксазолинском групом у С-17 бочном низу. Испитана је биолошка активност одабраних новосинтетизованих деривата ЖК према пет хелијских линија хуманих канцера и једној здравом хелијској линији, као и према четири бактеријске културе. Као полазна једињења коришћене су комерцијално доступне жучне киселине: холна киселина (ХК) и дехидрохолна киселина (**13**). У првој фази рада, ХК је преведена у 3-оксо (**4**), 7-оксо (**5**), 12-оксо (**9**) и 7,12-диоксо (**12**) деривате, ради добијања електрофилног центра на стероидном скелету. За добијање једињења **4**, ХК је естерификована са мрављом киселином и преведена у триформил естар **1**, који је селективном хидролизом са метанолним раствором амонијака преведен у диформил дериват **2**. Једињење **2** је најпре оксидацијом са Џонсовим реагенсом, а затим базном хидролизом преведено у 3-оксо дериват **4**. Региоселективном оксидацијом ХК са NBS-ом добијен је 7-оксо дериват **5**. У циљу добијања 12-оксо деривата **9**, ХК је преведена у метилестар **6**, коме су селективно ацетиловане хидроксилне групе у положају С-3 и С-12, уз настајање диацетата **7**. Оксидацијом **7** са Џонсовим реагенсом добијен је дериват **8**, који је сапонификован до 12-оксо деривата **9**. У реакцији трансестерификације са бутил-ацетатом, ХК је преведена у дихидрокси дериват **10**, који је оксидацијом дао **11**. Уклањањем ацетокси и бутилестарске заштите код једињења **11** добијен 7,12-диоксо дериват **12**.

Друга фаза рада је обухватала добијање оксазолинских деривата ЖК. Холна киселина, као и монооксо деривати **4**, **5** и **9** су, најпре преведени у одговарајуће формилокси естре **1**, **14**, **15** и **16**, респективно. У наредном кораку је карбоксилна група једињења **1**, **14**, **15** и **16** преведена у амид са 2-амино-2-метилпропанолом уз коришћење EEDQ-а, при чему су добијени амиди **17**, **18**, **19** и **20**, који су у реакцији са тионил-хлоридом преведени у одговарајуће оксазолине **21**, **22**, **23** и **24**. Формилокси заштита је уклоњена са КОН у кључалом метанолу. На овај начин синтетизовани су оксазолински деривати **25**, **26**, **27** и **28**. Једињења **12** и **13** су на сличан начин преведена у амиде **29** и **30**, који су у реакцији са тионил-хлоридом дали оксазолине **31** и **32**.

У трећој фази рада кето деривати са С-24 карбоксилном групом, као и деривати са оксазолинском групом су подвргнути реакцијама са Грињаревим реагенсима. 7-Оксо дериват **5** је у реакцији са MeMgI, EtMgBr, BuMgCl и OctMgBr дао одговарајуће метил- **33**, етил- **34**, бутил- **35** и октил- **36** деривате. Реакције су се одвијале стереоселективно, пошто је добијен само један епимер. Како је на основу рендгеноструктурне анализе деривата **33** утврђена β конфигурација метил групе на С-7, претпостављено је да су и код деривата **34-36**, оне исто тако β -оријентисане. Оксазолински 7-оксо дериват **27** је такође подвргнут реакцијама са наведеним Грињаревим реагенсима, при чему су добијени метил- **37**, етил- **38**, бутил- **39** и октил- **40** деривати. У реакцији деривата **27** са BuMgCl и OctMgBr на температури кључања реакционе смеше, поред алкиловања у положају С-7, долази и до парцијалне хидролизе оксазолинског прстена и настајања амида **41** и **42**, респективно. Реакцијом 12-оксо киселине **9** са MeMgI добија се 12 β -метил-3 α ,7 α ,12 α -трихидрокси-5 β -холанска киселина (**43**). Реакција је текла стереоселективно, а конфигурација на С-12 је одређена ROESY НМР експериментом. У реакцијама EtMgBr и BuMgCl са **9**, на -20 °С, добијају се комплексне смеше производа са ХК као доминантним производом. 12-Оксо оксазолински дериват **28** са поменутих Грињаревим реагенсима даје метил- **44**, етил- **45**, бутил- **46** и октил- **47** деривате респективно. У реакцији EtMgBr, тј. BuMgCl, са једињењем **28**, поред очекиваних алкил деривата **45**, тј. **46**, настаје и трихидрокси дериват **25**, као резултат редукције С-12 кето групе. Настајање

редукционог производа се објашњава стерним разлозима и изражено је на температури од $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакције алкиловања 3-оксо-деривата **4** у условима Грињареве реакције нису биле успешне и изоловано је само полазно једињење **4**. Објашњење овог резултата је настајање нуклеофилног енолатног аниона услед апстракције α -протона Грињаревим реагенсом. Ово је потврђено реакцијом **4** са EtMgBr , која је прекинута додатком D_2O , при чему је добијено једињење **4D** са деутеријумом на C-4 угљенику. У реакцији алкиловања 3-оксо оксазолинског деривата **26** са BuMgCl долази само до делимичне хидролизе оксазолинског прстена и настајања амида **48**.

У наредној фази је вршено уклањање оксазолинске заштите код деривата **39** и **40** са воденим раствором хлороводоничне киселине, при чему су као главни производи добијени Δ^6 алкени **49** из **39** и **51** из **40**, и у нешто мањем приносу алкилиденски деривати **50** из **39** и **52** из **40**.

Следећа фаза рада је подразумевала реакције олефинације 7-оксо, 7,12-диоксо и 3,7,12-триоксо деривата ЖК са Витиговим реагенсима. Реакцијом 7-кето киселине **5** са етилтрифенилфосфонијум-бромидом добијен је дериват **53**. У истој реакцији оксазолински дериват **27** је дао етилиден **54**. Обе реакције се одигравају стереоселективно уз настајање само *E* производа. Реакције 7,12-диоксо деривата са C-24 карбоксилном групом (**12**), као и оксазолинском групом у C-17 бочном низу (**31**), са Витиговим реагенсом су регио- и стереоселективне, и добијају се (*E*)-7-моетилиденски деривати **55** и **56**. У реакцији дехидрохолне киселине (**13**) са илидом насталим у реакцији етилтрифенилфосфонијум-бромида са *t*-BuOK добија се смеша (*E/Z*)-3-етилиден-7,12-диоксо-5 β -холанске киселине (**57a** и **57b**) и (*3E/Z,7E*)-3,7-диетилиден-12-оксо-5 β -холанске киселине (**58a** и **58b**). При сличним реакционим условима, 3,7,12-триоксо-оксазолин **32** даје стереоизомерну смешу 2-[(*E/Z*)-3-етилиден-7,12-диоксо-24-нор-5 β -холано-23-ил]-4,4-диметилксазолина (**59a** и **59b**) и стереоизомерну смешу 2-[(*3E/Z,7E*)-3,7-диетилиден-12-оксо-24-нор-5 β -холано-23-ил]-4,4-диметилксазолина (**60a** и **60b**). Стереохемија олефина **53**, **55** и **58** је утврђена ROESY NMR експериментима, а код једињења **55** и рендгеноструктурном анализом. Оксидацијом **53** са Џонсовим реагенсом је добијен 3,12-диоксо дериват **61**. У реакцијама једињења **27**, **31** и **32** са бутилиденским илидом није дошло до олефинације. Стереоселективност Витигове реакције на карбонилну групу у положају C-7 и настајање *E* олефина је условљена релативном близином стероидног D прстена који онемогућава настајање *Z* производа због преклапања ван дер Валсових радијуса етилиденске метил групе и C-15 метилenske групе. Нерактивност кето групе у положају C-12 код 7,12-диоксо деривата **12** и **31** се објашњава стерним сметњама бочног низа на C-17 и ангуларне C-18 метил групе. Карбонилна група у положају C-3 се може посматрати као симетричан кетон, па је вероватноћа формирања *E* или *Z* изомера иста, што потврђују и експерименти у којима се добија еквиоларна смеша оба изомера.

Деривати ЖК су у наредној фази подвргнути реакцијама са одабраним Хорнер–Водсворт–Емонсовим (ХВЕ) реагенсима. Једињење **27** није реаговало са дибутил-бутилфосфонатом, триметилфосфоноацетатом, као ни са диетил-2-брометилфосфонатом, у присуству *t*-BuOK и у кључалом THF-у. 7,12-Диоксо-оксазолин **31** у реакцијама са дибутил-бутилфосфонатом у присуству *t*-BuOK у THF није реаговао како на температури од $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, тако ни на температури кључања реакционе смеше. 3,7,12-Трикето дериват **32** је такође подвргнут реакцијама са поменутиим ХВЕ реагенсима, од којих је једино триметил-фосфоноацетат реаговао, при чему се добила смеша *E* и *Z* изомера **62a** и **62b**. Реакцијом 3-оксо деривата **4** са триметилфосфоноацетатом добијена је стереоизомерна смеша олефина **63a** и **63b**, која је након сапонификације дала само *E*-дикиселину **64**.

Амиди **65** и **66** су добијени у реакцији етилиденских деривата **53** и **55** са 2-амино-2-метилпропанолом и EEDQ. Користећи сличну процедуру, синтетисани су и амиди **67** из холне киселине и **68** из 7-оксо-деоксихолне киселине.

7-Етилиденски дериват **53** и Δ^6 -7-бутил дериват **49** су подвргнути хидрогенацији са Адамсовим катализатором, при атмосферском притиску водоника. Етилиденски дериват **53** је хидрогенован у смеси глацијалне сирћетне киселине и концентроване HCl, при чему је добијен ацетокси дериват **69**, који је након базне хидролизе дао један епимер 7-етил деривата **70**. Хидрогеновање Δ^6 двоструке везе бутил деривата **49** је рађено у MeOH и добијен је један стереоизомер 7-бутил једињења **71**.

У завршној фази рада испитана је антитуморска и антимикуробна активност одабраних синтетизованих деривата жучних киселина. Применом МТТ теста, за једињења **5**, **12**, **13**, **25**, **27**, **29**, **30-32**, **53-56** и **64-68**, као и за ХК, испитана је активност према пет туморских хелијских линија: MCF-7, MDA-MB-231, PC3, HeLa и HT-29. Поред туморских хелија, испитана је и

антипролиферативна активност према нормалним ћелијама феталних фибробласта плућа – MRC-5. Према ћелијској линији MCF-7 умерену до задовољавајућу антипролиферативну активност показала су једињења **27** (IC₅₀ 22.52 µM), **29** (IC₅₀ 16.46 µM) и **54** (IC₅₀ 14.31 µM). Према ћелијама MDA-MB-231 веома потентну антипролиферативну активност показала су једињења **55** (IC₅₀ 1.07 µM), **66** (IC₅₀ 1.79 µM) и **56** (IC₅₀ 5.85 µM), док је једињење **13** показало задовољавајућу антипролиферативну активност (IC₅₀ 12.18 µM). Задовољавајућу антипролиферативну активност према ћелијској линији PC3 показало је осам једињења (**27**, **29**, **31**, **56**, **61**, **65**, **66** и **68**), док су оксазолин **25** и амид **30** показали умерену активност. Снажну антитуморску активност према HeLa ћелијама су показала једињења **66** (IC₅₀ 4.07 µM), **61** (IC₅₀ 5.19 µM) и **27** (IC₅₀ 10.00 µM), док су једињења **31** и **56** показала задовољавајућу активност. Четири тестирана једињења (**12**, **27**, **55** и **67**) су показала слабу антитуморску активност према ћелијама HT-29. Већина тестираних једињења су била потпуно неактивна према MRC-5 ћелијама, са изузетком **66** и **56** која су показивала слабу цитотоксичност (IC₅₀ 30.08 и 32.8 µM, респективно).

Одабраним дериватима ЖК је одређена антимикуробна активност према четири соја бактерија од којих су две грам-негативне бактерије (*Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) и две грам-позитивне бактерије (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*). У случају бактерије *E. coli* деривати **13** и **27** су испољили антибактеријску активност, док су према *P. aeruginosa*, антибактеријску активност испољавали ХК, **5**, **27**, **53**, **67** и **68**. Према бактерији *B. cereus* осам испитиваних једињења (**27**, **53**, **54**, **55**, **56**, **61**, **65** и **67**) је показивало антимикуробну активност, с тим да су деривати **53**, **55** и **61** показали скоро два пута већу активност у односу на одговарајући антибиотик.

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

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидат је веома студиозно приступио обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичке целине. Резултати истраживања су јасно и систематски изложени и добро илустровани помоћу прегледних схема, слика и табела. Успешно су примењене савремене методе органске синтезе, а кандидат је показао и добро познавање физичко-хемијских метода, које је користио за доказивање структуре новосинтетизованих једињења. Поред тога, показао је и добро разумевање код интерпретације биолошких тестова, што говори да кандидат има способност за интердисциплинарни приступ овој сложеној проблематици.

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
Да, Комисија оцењује да је докторска дисертација урађена потпуно у складу са образложењима наведеним у пријави теме.
2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Да, дисертација садржи све битне елементе – дефинисање теме истраживања, преглед постојећих истраживања, јасан и прегледан приказ резултата и њихову дискусију, детаљан приказ експерименталних резултата, списак литературе и закључак.
3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци
 Комисија сматра да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног рада. У дисертацији је детаљно описана синтеза 71 деривата жучних киселина полазећи од холне или дехидрохолне киселине, од којих су већина новосинтетисана једињења. Резултати у дисертацији су дали увид у специфичност понашања оксо деривата жучних киселина и њихових амидних или оксазолинских аналога у реакцијама са одабраним угљеничним нуклеофилима. Ова сазнања су од велике важности за будуће трансформације стероидних једињења сличног типа. Испитан је утицај одабраних синтетисаних једињења на инхибицију раста пет туморских и једне нормалне ћелијске линије са резултатима који дају легитимитет подробнијем испитивању модификованих жучних киселина као антитуморских агенаса. Део добијених резултат је публикован у три научна рада

категирија M21 и M22 што указује на висок квалитет и оригиналност спроведених истраживања.
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: „Синтеза и биолошка испитивања нових деривата жучних киселина“, а кандидату Срђану Бједову одобри одбрана.

КОМИСИЈА

Др Јанош Чанади, редовни професор Природно-математичког факултета у Новом Саду, председник

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

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

Др Сениша Марков, редовни професор Технолошког факултета у Новом Саду, члан

Др Михаљ Поша, ванредни професор Медицинског факултета у Новом Саду, члан

У Новом Саду
28.12.2016.