

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

<p><b>I. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b></p> <p><b>1. Датум и орган који је именовao комисију:</b> Комисију именовало Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, на својој XXX седници, одржаној 26. 01. 2015. год.</p> <p><b>2. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Др Мирјана Попсавин, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора у звање: 01. 01. 2003. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, председник</li> <li>• Др Велимир Попсавин, редовни професор, ужа научна област Органска хемија и Биохемија, датум избора 06. 08. 1999. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, ментор</li> <li>• Др Евгенија Ђурендић, редовни професор у пензији, ужа научна област Органска хемија, датум избора 30. 10. 2002. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, члан</li> <li>• Др Марија Сакач, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора 08. 11. 2007. године, Природно-математички факултет, Нови Сад, члан</li> <li>• Др Богдан Шолаја, редовни члан САНУ, редовни професор, ужа научна област Органска хемија, датум избора 21. 09. 2000. године, Хемијски факултет, Београд, члан</li> </ul>
<p><b>II. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b></p> <p><b>1. Име, име једног родитеља, презиме:</b> Лована (Милоје) Француз</p> <p><b>2. Датум рођења, општина, држава:</b> 14.09.1982., Нови Сад, Србија</p> <p><b>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив:</b> Природно-математички факултет, Биохемија, Мастер биохемије</p> <p><b>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:</b> 2008. године, Докторске студије хемије</p> <p><b>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: —</b></p> <p><b>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: —</b></p>
<p><b>III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Нове изостере и биоизостере природних стирил-лактона: дизајн, синтеза и антипролиферативна активност</p>
<p><b>IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Страна: 249 (од тога 64 стране у оквиру поглавља Прилог I и 15 страна у оквиру поглавља Прилог II, на CD-u). Број поглавља: 11 (заједно са поглављем Прилог I и Прилог II, на CD-u). Литературних цитата: 104. Табела: 87 (од тога 68 табела у оквиру поглавља Прилог II на CD-u). Шема: 60. Слика: 233 (од тога 126 слика NMR спектра у оквиру поглавља Прилог I и 73 слике у оквиру поглавља Прилог II, на CD-u).</p>

## V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У одељку **Увод** изложен је значај дизајна, синтезе и биомедицинских испитивања изостера и биоизостера природних стирил-лактона, у циљу проналажења нових и селективнијих антитуморских агенаса. У овом делу су затим дефинисани основни циљеви истраживања који подразумевају дизајнирање и синтезу нових антитуморских агенаса изостерном варијацијом структуре природних стирил-лактона типа гониофуфурана. Предмет овог рада је такође и испитивање антипролиферативне активности добијених изостера и биоизостера природних лактона, њихова детаљна биолошка испитивања која се односе на механизам ћелијске смрти, као и покушај успостављања корелационих односа између структуре и цитотоксичне активности.

Циљеви и значај истраживања су наведени јасно и прецизно.

У **Општем делу** дисертације дат је преглед новије литературе која се односи на налажење у природи, структуру и особине стирил-лактона као и њихово биогенетско порекло, док се већи део овог поглавља односи на преглед синтетичких метода за добијање аналога стирил-лактона типа гониофуфурана и њихову антипролиферативну активност, као и досада познате механизме биолошког дејства.

Комисија констатује да је приложени литературни преглед одговарајући и свеобухватан, а презентован је јасно и концизно.

У поглављу **Наши радови** детаљно су презентовани и дискутовани добијени резултати, који су груписани у следећа три одељка:

- Дизајн изостера и биоизостера природних стирил-лактона
- Синтеза изостера и биоизостера природних стирил-лактона (Синтеза почетних интермедијера, Синтеза халогенидних и псеудо-халогенидних изостера природних стирил-лактона типа гониофуфурана, Синтеза биоизостера стирил-лактона типа гониофуфурана, синтеза енантиомерних биоизостера стирил-лактона типа гониофуфурана)
- Биолошка активност изостера и биоизостера природних стирил-лактона (Испитивање цитотоксичности изостера и биоизостера природних стирил-лактона, Успостављање корелационих односа (SAR) код изостера и биоизостера синтетизованих стирил-лактона, Механизам биолошког дејства синтетизованих изостера и биоизостера гониофуфурана и 7-*epi*-гониофуфурана)

Резултати који су добијени у оквиру ове докторске дисертације су нови и значајни и јасно указују на актуелност и оригиналност реализованих истраживања.

**Експериментални део** рада садржи детаљне поступке добијања свих интермедијера и финалних производа. Поред тога, у оквиру овог одељка кандидат је дао асигнацију IR- NMR- и M-спектара, којим су окарактерисана сва синтетизована једињења. Експериментални поступци су приказани јасно и са довољно детаља да омогуће њихово понављање. Сви синтетизовани интермедијери и финални производи адекватно су окарактерисани савременим спектроскопским методама чиме је недвосмислено потврђен њихов идентитет и чистота.

Поглавље **Закључак** садржи закључке који су изведени на основу приказаних резултата у поглављу Наши радови. Закључци су формулисани јасно и прегледно.

У одељку **Summary** су приказани закључци који су изведени на основу приказаних резултата у поглављу Наши радови. Закључци су формулисани на енглеском језику јасно и прегледно.

У одељку **Литература** су наведени радови који су коришћени како за писање Општег дела рада, тако и у оквиру поглавља Наши радови и Експериментални део. Све референце су наведене прецизно и прегледно.

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

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

1. G. Benedeković; M. Popsavin, J. Francuz, I. Kovačević, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Divjaković, V. Popsavin: "Design, synthesis and SAR analysis of antitumour styryl lactones related to (+)-crassalactones B and C", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 87, 237. [IF 3.432 (2013, 13/58); M21 (8)]

2. G. Benedeković, J. Francuz, I. Kovačević, M. Popsavin, B. Srećo Zelenović, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Divjaković, V. Popsavin: "Conformationally constrained goniofufurone mimics as inhibitors of tumour cell growth: Design, synthesis and SAR study", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 82, 449. [IF 3.432 (2013, 13/58); M21 (8)]
3. V. Popsavin, J. Francuz, B. Srećo Zelenović, G. Benedeković, M. Popsavin, V. Kojić, G. Bogdanović: "Heteroannulated and 7-deoxygenated goniofufurone mimics with antitumour activity: Design, synthesis and preliminary SAR studies", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 5507. [IF 2.331 (2013, 25/58); M22 (5)]
4. J. Francuz, B. Srećo, M. Popsavin, G. Benedeković, V. Divjaković, V. Kojić, G. Bogdanović, A. Kapor, V. Popsavin: "Novel goniofufurone and 7-*epi*-goniofufurone mimics from an unexpected titanium-mediated displacement process", *Tetrahedron Letters*, **2012**, 53, 1819–1822. [IF 2.618 (2010, 20/56); M22 (5)]
5. V. Popsavin, B. Srećo, G. Benedeković, J. Francuz, M. Popsavin, V. Kojić, G. Bogdanović: "Design, synthesis and antiproliferative activity of styryl lactones related to (+)-goniofufurone", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45, 2876–2883. [IF 3.193 (2010, 11/54); M21 (8)]
6. V. Popsavin, G. Benedeković, B. Srećo, J. Francuz, M. Popsavin, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Divjaković: "Enantiodivergent synthesis of cytotoxic styryl lactones from D-xylose. The first total synthesis of (+)- and (–)-crassalactone C", *Tetrahedron*, **2009**, 65, 10596–10607. [IF 3.219 (2009, 13/57); M21 (8)]
7. V. Popsavin, B. Srećo, G. Benedeković, M. Popsavin, J. Francuz, V. Kojić, G. Bogdanović: "Design, synthesis and antiproliferative activity of two new heteroannulated (–)-muricatacin mimics", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 5182–5185. [IF 2.531 (2008, 16/40); M22 (5)]
8. V. Popsavin, G. Benedeković, B. Srećo, M. Popsavin, J. Francuz, V. Kojić, G. Bogdanović: "Synthesis and antiproliferative activity of unnatural enantiomers of 7-*epi*-goniofufurone and crassalactone C", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 5178–5181. [IF 2.531 (2008, 16/40); M22 (5)]
9. V. Popsavin, G. Benedeković, B. Srećo, M. Popsavin, J. Francuz, V. Kojić, G. Bogdanović: "Divergent synthesis of cytotoxic styryl lactones from D-xylose. The first total synthesis of (+)-crassalactone C", *Organic Letters*, **2007**, 9, 4235–4238. [IF 4.802 (2007, 4/56); M21 (8)]

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У раду су остварене тоталне синтезе 16 халогенидних изостера природних стирил-лактона типа гониофурона, полазећи из D-глукозе. Синтетизовано је осам директних изостера (+)-гониофурона (**I**) од којих четири имају слободну хидроксилну групу у положају C-5 (**29**, **34**, **38** и **43**), док четири садрже бензилетарску групу у истом положају (**27**, **33**, **37** и **41**). Такође, је синтетизовано и осам директних изостера 7-*epi*-(+)-гониофурона (**II**), од којих четири имају слободну хидроксилну групу у положају C-5 (**30**, **35**, **39** и **44**), док четири липофилнија деривата имају бензилетарску групу у истом положају (**26**, **32**, **36** и **42**). За синтезу халогенидних аналога било је неопходно синтетизовати погодне интермедијере. Вишефазним хемијским трансформацијама D-глукозе добијени су кључни бензилни алкохоли (једињења **4** и **5**), који су даљим хемијским трансформацијама дали потребне фуранофуранонске скелете код лактона **19**, **21**, **23** и **25**. Они су потом дејством TiCl<sub>4</sub> или TiBr<sub>4</sub> преведени у хлоридне, односно бромидне изостере. Јодидне изостере су добијене применом Carreg-Samuelsson-ове реакције, док је синтеза флуоридних изостера постигнута дејством DAST на одговарајуће 5-*O*-бензилне-деривате.

У раду је остварена и синтеза азидних изостерних аналога природних производа **I** и **II** (једињења **47** и **48**) који су добијени нуклеофилним отварањем оксетанског прстена кључних интермедијера **46** и **49** триметилсил-азидом у присуству бортрифлуорид-етерата. Оксетани **46** и **49** су добијени двофазном секвенцом из лактона **19** и **21**, која је обухватала дебензиловање праћено интрамолекуларном Mitsunobu-овом циклизацијом. Поред очекиваних азидних изостера добијен је и азидни дериват **50** са необичним пиранофуранонским системом прстена.

У овом раду је остварена и синтеза више нових биоизостера природних стирил-лактона **1** и **2**, дизајнираних применом стратегије затварања и отварања бензоксепанског прстена (**31**, **51** и **53**). Бензоксепан **31** који је добијен као споредни производ у реакцији са TiCl<sub>4</sub>, независно је синтетисан из лактона **21** директном циклизацијом у присуству TFA. Директним отварањем оксепанског прстена **31** у условима хидрогенолизе добијен је аналог **51**. За добијање аналога **53**, било је потребно започети синтезу из погодног интермедијера **15**. Овај интермедијер је добијен из D-глукозе вишефазним хемијским трансформацијама, а потом је подвргнут хидролитичком уклањању изопропилиденске заштите и базно катализованој кондензацији резултујућег лактола са Meldrum-овом киселином при томе је добијен жељени лактон **53**.

Синтеза четири 5-*O*-метил-деривата природних производа **1** и **2** (једињења **57**, **59**, **60** и **61**) започета је из D-

глукозе, која је вишефазним хемијским трансформацијама преведена у кључне алкоhole **8** и **9**. Након уклањања заштитних група и кондензације са Meldrum-овом киселином добијени су деривати **57** и **59**. Даљом оксидацијом ових лактона добијен је кетон **60**, а затим и дефениловани аналог **61**.

Поред аналога из (+)-серије у раду је остварена и синтеза енантиомера оксепана **31** (*ent-31*) и одговарајућих аналога са отвореним оксепанским прстеном (*ent-51* и *ent-53*). Ове биоизостере су добијене полазећи из енантиомерних лактона *ent-19* и *ent-21*, који су раније синтетизовани у нашој лабораторији. Применом истих реакционих услова као при синтези аналога (+)-енантиомерне серије добијени су оксепан *ent-31* и аналог *ent-51*. Аналог *ent-53* добијен је применом другачијег синтетичког поступка. У реакцији **23** и **25**, односно *ent-23* и *ent-25* са TiF<sub>4</sub> поред оксепана **31** и *ent-31* добијени су и деоксигеновани деривати **45** и *ent-45*, што представља нови пример супстратом контролисане хемоселективности.

У другом делу рада, испитан је утицај синтетизованих једињења, како познатих природних лактона [(+)-гониофуфурона (**I**) и 7-*epi*-(+)-гониофуфурина (**II**)], тако и њихових изостера и биоизостера (укупно 33 једињења), на пролиферацију девет малигних (K562, HL-60, Jurkat, Raji, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa и A549) и једне нормалне ћелијске линије (MRC-5).

Као најпотентнији цитотоксични агенс показао се флуоридни аналог **44** који је према Raji ћелијама (IC<sub>50</sub> 0.03 μM), испољио чак 99 пута јачу активност од доксорубицина (IC<sub>50</sub> 2.98 μM). Друго једињење по ефикасности је хлорид **30**, које је према K562 ћелијама (IC<sub>50</sub> 0.11 μM) било око 2 пута активније од доксорубицина, док је према Jurkat ћелијама (IC<sub>50</sub> 0.03 μM) показало исту активност као доксорубицин. Бромид **34** се показао као најпотентнији антипролиферативни агенс према HL-60 ћелијама (IC<sub>50</sub> 0.11 μM), чак 8 пута активнији од доксорубицина. Најпотентнији инхибитор раста ћелија хуманог канцера плућа (A549) је кетон **60** (IC<sub>50</sub> 2.58 μM), који је скоро два пута активнији од доксорубицина. Веома јаку активност према ћелијама HT-29, на које је мали број испитиваних једињења био активан, испољио је бензоксепан **31** (IC<sub>50</sub> 0.24 μM). Јодид **39** је испољио најбољу активност према ћелијама MCF-7 (IC<sub>50</sub> 1.28 μM). HeLa ћелије су се показале најосетљивије на азид **48** (IC<sub>50</sub> 0.12 μM). Док је 5-*O*-бензил-7-хлоро дериват **26** испољио најјачу активност према ћелијској линији MDA-MB 231 (IC<sub>50</sub> 1.11 μM).

Коначно, важно је истаћи да су сви синтетизовани молекули били потпуно неактивни према нормалним ћелијама хуманих фибробласта плућа (MRC-5), што указује да су они селективни антитуморски агенси, што може бити од пресудног значаја за њихову практичну примену.

На основу SAR анализе може се закључити да су изведене изостерне замене довеле до добијања аналога код којих је уочено веома значајно повећање антипролиферативне активности.

Додатна биолошка испитивања која се односе на механизам деловања су показала да новосинтетизована једињења утичу на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса, а веома значајни резултати су регистровани код 15 једињења. Такође је утврђено да већина аналога значајно повећава проценат специфичне апоптозе, а Western blot анализом је потврђено да изостере и биоизостере не изазивају апоптозу преко протеина Bcl-2 фамилије, него делују каспазно-зависним путем.

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

## VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидат је веома рационално приступио обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичке целине. Резултати истраживања су аналитички изложени, а где је то било неопходно статистички су обрађени (нпр. код биолошких тестова). Добијени резултати су детаљно дискутовани и критички упоређени са расположивим резултатима из литературе. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговоре на задатке и циљеве постављене у пријави ове докторске дисертације.

## IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

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

2. *Да ли дисертација садржи све битне елементе?*

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

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

Комисија сматра да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног рада. Развијени су нови и оригинални поступци синтезе 33 изостере и биоизостере природних цитотоксичних стирил-лактона, а затим је испитана њихова цитотоксична активност према девет туморских и једној нормалној ћелијској линији. Поједина једињења су показала знатно јачу цитотоксичност од комерцијалног цитостатика доксорубицина, а за разлику од истог, потпуно су неактивна према здравим ћелијама. Такође су добијени веома значајни резултати који упућују на механизам биолошког дејства цитотоксичних стирил-лактона. Део добијених резултата из ове докторске дисертације већ је публикован у облику четири научна рада, категорије М21 (радови под редним бројевима 2 и 5, стр. 3) и М22 (радови под редним бројевима 3 и 4, стр. 3), што указује на висок квалитет и оригиналност спроведених истраживања. При томе, у радовима под редним бројевима 3 и 4 доминирају резултати из докторске дисертације кандидата, док преостали радови такође садрже резултате из поменуте дисертације, али у нешто мањем обиму.

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

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

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу свега наведеног, комисија предлаже да се прихвати позитивна оцена докторске дисертације под насловом: “Нове изостере и биоизостере природних стирил-лактона: дизајн, синтеза и антипролиферативна активност” и да се кандидату Јовани М. Француз одобри одбрана.

**КОМИСИЈА:**

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

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

Др Евгенија Ђурендић, редовни професор Природно-математичког факултета у Новом Саду у пензији, члан

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

Др Богдан Шолаја, редовни члан САНУ, редовни професор Хемијског факултета у Београду, члан

У НОВОМ САДУ И БЕОГРАДУ

28. 01. 2015.