

Универзитет у Београду-Хемијски факултет
Наставно-научном већу Хемијског факултета

Предмет: Извештај Комисије за преглед и оцену докторске дисертације **Јелене С. Радивојевић**, истраживача сарадника запосленог на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду.

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета, Универзитета у Београду, одржаној 9. јуна 2016. године, изабрани смо у Комисију за преглед и оцену докторске дисертације **Јелене С. Радивојевић**, истраживача сарадника запосленог на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, под насловом:

„Мономери поли(хидроксиалканоата) као основа за добијање биолошки активних једињења“

Пошто смо поднету дисертацију прегледали, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Јелене С. Радивојевић написана је на 120 страна и садржи 31 схему, 18 слика, 6 табела и 210 летературних навода. Теза садржи следећа поглавља: *1. Увод, 2. Општи део, 3. Наши радови, 4. Експериментални део, 5. Закључак на српском језику, 6. Закључак на енглеском језику, 7. Литература.* Поред наведеног, дисертација садржи: *Садржај, Листу скраћеница и Захвалницу.*

У *Уводу* кандидат дефинише тему докторске дисертације указујући на значај обновљивих извора, као што је биопластика, добијена биотехнолошким поступком из ферментације микроорганизама, за добијање потенцијално биолошки активних једињења.

У *Општем делу* дат је кратак приказ добијања биополимера коришћењем обновљивих извора, као и њихова разноврсна примена. Значајна класа биодеграбилних полимера су полиестри као што су поли(хидроксиалканоати) (ПХА). Ови полимери се

најчешће добијају из бактерија коришћењем обновљивих извора (глукоза, глицерол, масне киселине) или из отпадног материјала (поли(етилен), поли(стирен)). У састав ПХА улази више од 150 различитих мономерних јединица, што зависи од врсте микроорганизама која га производи. Мономери ПХА су 3-хидроксиалканске киселине (3-ХА) са искључиво (*R*) конфигурацијом на хиралном центру, које у бочном ланцу садрже читав спектар функционалних група. Због великог значаја и широке примене 3-ХА, дат је преглед различитих метода за њихово добијање. С обзиром на велики биолошки потенцијал 3-ХА, у даљем приказу литературе дат је преглед њихових антимикробних и антифунгалних активности. Затим је приказана улога 3-ХА како липофилне фармакофоре. Такође, описано је добијање једињења са халогеном фармакофором и коњугата 3-ХА и биолошки активних пептида, у циљу модулирања активности пептида.

У одељку *Наши радови* описане су процедуре за добијање (*R*)-3-хидроксиоктанске киселине и њених метил- и безил-естара полазећи од биотехнолошки добијеног поли(хидроксиалканоата). Затим је описана хемијска синтеза 3-хидроксиалканских киселина и деривата, реакцијом по Реформатском и редукцијом β-кетокиселина. Приказано је добијање 3-халоген супституисаних деривата октанске и деканске киселине полазећи од биотехнолошки добијених (*R*)-енантиомера, као и од хемијски синтетисане рацемске смеше 3-хидроксиалканских киселина. Детаљно је описана анализа спектроскопских података деривата 3-флуорооктанске киселине.

У делу где је описано испитивање биолошке активности, кандидат је приказао резултате тестирања свих једињења добијених из 3-хидроксиоктанске киселине на антимикробну (панел испитиваних организама обухвата Грам позитивне и Грам негативне бактерије, и врсте *Candida albicans* и *Microsporium gypseum* као представнике гљива) и антипролиферативну активност на здравој ћелијској линији (хуманим фибробластима MRC5). Такође је приказан утицај одређених деривата на бактеријску међућелијску комуникацију. Затим је описано добијање 3-хлордеканске киселине, која је коњугована са DP18L пептидом. Испитивана је биолошка активност 3-хлор-деканске киселине и коњугата на ћелије панкреаса (MiaPaCa).

У *Експерименталном делу* кандидат је дао детаљан опис процедура којима су синтетисана нова једињења. Наведене су физичко хемијске карактеристике као и резултати структурних анализа једињења, који су добијени применом савремених инструменталних техника (НМР, ИЦ, МС). Описане су методе које су коришћене за испитивање биолошке активности 3-ХА и добијених деривата.

Добијени резултати укратко су приказани у *Закључку* на српском и енглеском језику. Дат је списак *литературе*, затим прилози сачињени од табела биолошке активности, као и кратка биографија кандидата.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

У првоме делу докторске дисертације приказани су резултати развоја методологије за добијање 3-хидроксиоктанске киселина и деривата полазећи од ПХА, добијеног биотехнолошким поступком помоћу бактерија *Pseudomonas putida GPol* соја. С обзиром да се биолошки полимер састоји од (*R*)-3-хидроксиоктанске киселине као мономера, деполимеризацијом су добијени киселина и њени метил- и бензил-естри уз очување конфигурације на хиралном центру. Као алтернатива биотехнолошким поступку, коришћене су процедуре за добијање 3-ХА хемијским путем. У реакцији по Reformatsky-ом, полазећи од хексанала и одговарајућих бромо-естара, добијени су метил- и бензил-естри 3-хидроксиоктанске киселине. Међутим, применом овог поступка добијени су производи у облику рацемата, што је инфериорније у односу на поступак деполимеризације.

Развијен је још један синтетички пут за добијање 3-ХА, где је прво добијен β -кетоестар октанске киселине који је потом редукован. Асиметрична редукција је изведена помоћу Nuygi-евог катализатора $\text{Ru}(\text{S-BINAP})\text{Cl}_2$, при чему је добијен оптички чист метил-(*S*)-3-хидроксиоктаноат (60%, 99% ee).

Халогена фармакофора је веома заступљена у биолошки активним једињењима. С обзиром да се 3-халогеналканске киселине не могу добити деполимеризацијом ПХА, развијени су поступци за њихово добијање супституцијом хидроксилне групе из 3-ХА. Као полазни материјал коришћене су 3-ХА добијене биотехнолошким и хемијским путем. Деривати са хлором су добијени третирањем 3-ХА, са тионил-хлоридом и триетиламином у диизопропил-етру на повишеној температури, у умерено добром приносу (46-56%). Са оптички активним естрима примењена је слаба енантиселктивност (17% ee за метил-естар и 27% ee за бензил-естар). Бромовање 3-ХА извршено је помоћу угљен-тетрабромида и трифенил-фосфина. Естри 3-бромоктанске киселине добијени су у приносу од 32% и 95%, док је са хиралним супстратима постигнута лоша енантиселктивност (16% ee и 1% ee). Деривати са флуором су синтетисани у реакцији 3-ХА са диетиламинсумпор-трифлуоридом: Њихова структура одређена је коришћењем ^1H и ^{13}C НМР спектроскопије. У раду је приказана детаљна асигнација сигнала добијених НМР спектра.

β -Кетоестри, веома значајни интермедијери који се често користе за добијање биоактивних једињења, ефикасно су добијени оксидацијом 3-ХА помоћу Collins-овог реагенса (80% и 90%). Хидрогенолизом бензил-естара, који су синтетисани описаним процедурама, добијене су одговарајуће карбоксилне киселине. Хемијским трансформацијама 3-ХА синтетисано је 17 деривата, од којих је 10 једињења први пут описано.

Други део докторске дисертације обухватио је испитивање биолошке активности једињења добијених из 3-хидроксиоктанске киселине. За тестирање су коришћени бактеријски сојеви: *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium*, *Staphilococcus aureus*, *Listeria*

monocitogenes, *Pseudomonas aeruginosa PAO1* и два соја патогених гљива: *Candida albicans* и *Microsporium gipseum*. Антимикробна активност испитиваних једињења је поређена са антибактеријским и антифунгалним особинама октанске киселине. У тестове су такође били укључени и стандардни антибиотици. Сва једињења су прво подвргнута брзом тестирању у диск-дифузионом есеју. Резултати су показали да једињења немају значајнији антимикробни ефекат у односу на стандардне антибиотике, а да су једињења која садрже слободну карбоксилну групу била активнија од одговарајућих естара, те су у даљим тестовима разматране само киселине. Халогени деривати су показали већу активност у односу на 3-ХА. Испитивана једињења су показала већи потенцијал за инхибицију раста гљивица него бактеријских сојева.

Модулација међућелијске комуникације је занимљива као нова мета за деловање нових антимикробних агенаса. Да би неко једињење било кандидат за модулатора међубактеријске комуникације не би требало да показује значајније дејство на раст испитиваног соја. С обзиром да су нека наша једињења испуњавала наведени услов према соју *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, коришћена су за детаљнија тестирања у међубактеријској комуникацији. Киселине 3-хидроксиоктанска и 3-октенска су показале значајну инхибицију производње пиоцијанина и могли би се искористити за прекидање међућелијске комуникације опортуног патогена *P. aeruginosa*.

Цитотоксичност синтетисаних киселина испитивана је одређивањем анти-пролиферативне активности на хуманим фибробластима, при чему није уочена активност након 48 сати третмана.

Коњугацијом масних киселина и пептида добијају се коњугати код којих је биолошка активност измењена у односу на полазни пептид. У овом раду описано је добијање 3-хлордеканске киселине, према процедури за добијање 3-хлороктанске киселине, која је коњугована са DP18L пептидом. Испитивана је активност 3-хлордеканске киселине и коњугата на ћелије панкреаса (MiaPaCa). Сама хлорокиселина има вредност IC₅₀ 950 μM према MiaPaCa, док коњугат има IC₅₀ вредност 3,5 μM према ћелијама панкреаса. Везивањем хлорокиселине за пептид побољшава се активност пептида, што пружа нове могућности за добијање нових биосинтетичких једињења.

Ц) Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Синтеза нових биолошки активних једињења представља велики изазов и мотив у областима органске синтезе и медицинске хемије. Многи лекови се данас синтетишу помоћу хиралних синтона који се добијају асиметричном синтезом или из природних производа. Коришћење обновљивих извора за добијање биолошки активних једињења уклапа се у концепт Зелене хемије и одрживог развоја што га чини атрактивним у научној заједници.

Фокусирајући се на употребу биодеградабилних полимера, поли(хидроксиалканоата), за добијање потенцијалних биолошки активних једињења у корак смо са савременим трендовима у науци. Деполимеризацијом биолошког полимера, у коме је мономерна јединица (*R*)-3-хидроксиоктанска киселина, добија се енантимерно чиста киселина која представља хирални синтон за различита биолошки активна једињења. Супституцијом хидроксилне групе халогеном уводи се халогена фармакофора, која је веома заступљена у великом броју лекова, а не може се добити директним биотехнолошким поступком. Коњугацијом халоген-супституисаних киселина и пептида који показују антиканцерогено дејство добила би се нова биосинтетичка једињења која би омогућила развој нових лекова.

Д) Објављени радови који чине део докторске дисертације

Научни радови публиковани у међународним научним часописима:

1) J. Radivojevic, S. Škaro, L. Senerovic, B. Vasiljevic, M. Guzik, S. T. Kenny, V. Maslak, K. E. O'Connor, J. Nikodinovic-Runic: Polyhydroxyalkanoate -based 3-hydroxyoctanoic acid and its derivatives as a platform of bioactive compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 161–172. (ИФ 3,337; M21)

2) E. Szwej, M. Devocelle, S. Kenny, M. Guzik, S. O'Connor, J. Nikodinovic-Runic, J. Radivojevic, V. Maslak, A. T. Byrne, W. M. Gallagher, Q. R. Zulian, M. Zinn, K. E. O'Connor: The chain length of biologically produced (*R*)-3-hydroxyalkanoic acid affects biological activity and structure of anti-cancer peptides. *J. Biotechnology* **2015**, *204*, 7–12. (ИФ 2,871; M21)

Конгреси и саопштења:

1) Jelena Radivojević, Veselin Maslak, Branka Vasiljević, Kevin O'Connor, Jasmina Nikodinović-Runić: Funkcionalizacija bakterijskih polimera, IX Kongres Mikrobiologa Srbije, Beograd, 30. Maj-01. Jun 2013.

Е) Закључак Комисије

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске тезе Јелене С. Радивојевић под насловом „**Мономери поли(хидроксиалканоата) као основа за добијање биолошки активних једињења**“, закључила да је кандидат систематично и детаљно приказао добијање 3-хидроксиалканоатских киселина и деривата полазећи од биотехнолошки добијеног поли(хидроксиалканоата), као и хемијским путем. Даљим трансформацијама добијене су 3-халоген- и 3-кетокиселине. Кандидат је синтетисао 17 једињења полазећи од (*R*)-3-хидроксиоктанске киселине, од којих је 10 једињења први пут описано. Сва једињења су детаљно окарактерисана спектроскопским методама и тестирана је њихова антимикробна

и антипролиферативна активност. У оквиру ове тезе тестирана је биолошка активност коњугата 3-хлордеканске киселине и биолошки активног пептида DP18L.

Из ове докторске дисертације проистекла су два рада у врхунским међународним часописима (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* и *J. Biotechnology*).

Стога предлажемо Наставно-научном већу Хемијског факултета да кандидату Јелени С. Радивојевић одобри одбрану докторске дисертације под наведеним насловом.

У Београду, 12. 9. 2016.

Комисија

Др Веселин Маслак, доцент Хемијског факултета
Универзитета у Београду, ментор

Др Јасмина Никодиновић-Рунић, научни саветник,
Института за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство Универзитета у Београду, ментор

Др Зорана Ферјанчић, ванредни професор
Хемијског Факултета Универзитета у Београду

Др Игор Опсеница, доцент доцент Хемијског
факултета Универзитета у Београду,

Др Зорана Токић-Вујошевић, ванредни професор
Фармацеутског факултета Универзитета у Београду
