

Универзитет у Новом Саду Природно-математички факултет Департман за физику



Кристалографска и биолошка анализа 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрила

Дипломски рад

Ментор

Кандидат

Проф. др Оливера Клисурић

Божана Пејаковић

Нови Сад, 2017.

Садржај

Предг	овор	3	
1.	Дифракција	4	
2.	Рендгенски зраци. Основне особине		
3.	Кристали	6	
	3.1. Увод	6	
	3.2. Бравеове решетке	8	
	3.3. Милерови индекси и реципрочна решетка	9	
4.	Дифракција рендгенских зрака на кристалима	10	
	4.1. Дифракција Х-зрака	11	
	4.1.1. Брагов закон	11	
	4.1.2. Лауеов услов за дифракцију	12	
	4.2. Интензитет дифракције. Општи фактори од значаја за интензит	ет 13	
	4.2.1. Структурни фактор	14	
	4.3. Одређивање расподеле електронске густине у кристалу	15	
	4.3.1. Фуријеова синтеза	15	
	4.3.2. Решавање структуре кристала Фуријеовом анализом	16	
	4.3.3. Диферентна Фуријеова анализа	18	
	4.3.4. Утачњавање структуре. Метода најмањих квадрата	20	
-	4.3.5. Фактор поузданости	21	
5.	Стероидни хормони	23	
C	5.1. Естрогени: структура и везивање за рецептор	25	
6.	Експериментални део	29	
	6.1. Синтеза	29	
	6.2. Рендгенска структурна анализа	30	
	6.2.1. Once an aparype	50 24	
	6.5. Дифракциони, кристалографски и подаци о утачњавању 6.4. Лиализа водоцицици веза	34	
	65 Испитирано родатирног афинитота розирана тостираног	50	
	іелињења 5 за лиганл везујући домен естрогеног рецептора		
	ß (IDB-FRß)	37	
	6.5.1. Принцип теста	37	
	6.5.2. Сојеви квасаца, плазмили и услови раста	37	
	6.5.3. Флуоресцентни ћелијски есеј у квасцу	38	
7.	Лискусија и закључак	42	
Прило	IL	43	
Литера	атура	52	
Биогр	рафија	54	

Предговор

Интердисциплинарност је одавно почела да добија на значају како у научном свету, тако и у осталим сферама живота, јер традиционалне дисциплине не могу у потпуности решити одређене кључне проблеме, те своје циљеве усмеравају ка заједничкој сарадњи. Подела науке на области пружа практичне олакшице пре свега научницима који у различитим областима сарађују на заједничким пројектима.

Синергија три природне науке: физике, биологије и хемије доприноси развоју и усавршавању метода и пројеката који истражују што боље услове како би се одржао и унапредио живот на Земљи. У овом раду, пре свега примарни фокус је на физици и испитивању и разоткривању структуре једињења кристала које су синтетисли хемичари, а чије су карактеристике и особине касније испитивали биолози.

Дефинишући основне појмове дифракције, рендгенских зрака и кристала добијамо теоријску подлогу и математички модел који нам је потребан за даље истраживање. У даљем раду упознајући се са појмом стероидних хормона долазимо до синтезе нашег једињења. Полазећи од естрона, добијен је у неколико синтетских фаза 3-benziloksi-17hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril. Ова супстанца је кључни интермедијер у синтезама других супституисаних секоестронских деривата. Због своје антиестрогене активности, као и потпуног одсуства естрогеног ефекта међу њима се као најинтересантнији показао 3 -hidroksi-17-bromo-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitril. А како бисмо завирили у најфинију структуру кристала, конкретно новосинтетисаног једињења користили смо рендгенску структурну анализу. Завршно поглавље описује сам експеримент праћен дискусијом и закључком.

Овим путем желим да се захвалим свима који су допринели изради овог рада. Пре свега, Проф. др Оливери Клисурић, менторки за пружену велику подршку, несебичну помоћ, залагање и пажњу, професионално усмеравање и разумевање, као и за изузетно корисне сугестије приликом писања самог рада.

Такође се захваљујем Проф. др Анђелки Ћелић на указаном поверењу, издвојеном времену и исцрпној анализи и корекцији биолошког дела рада као и Софији Бекић на свим драгоценим саветима.

Посебно се захваљујем својој породици, пријатељима и колегама који су са пуно љубави увек били уз мене и пружали ми неизмерну подршку.

Нови Сад, октобар 2017.

Божана Пејаковић

1. Дифракција

Појам дифракције помиње се још у 17. веку, а везује се за име Франческа Грималдија (*Francesco Maria Grimaldi*), који је један од првих покушао да објасни проблем простирања сунчевих зрака кроз мале пукотине. Сам назив дифракција потиче од латинске речи *diffringere* што значи "разбити у комаде". Такође, ту су и остали научници тога времена који су се бавили појавом дифракција, а један међу њима био је и Кристијан Хајгенс (*Christiaan Huygens*) који је објаснио принцип дифракције таласа. Сам појам дифракције представља привидно скретање таласа са првобитног правца простирања при његовом наиласку на ивице отвора. Тада се мали отвори понашају као нови извори таласа што је познато као Хајгенсов принцип, приказано на слици 1.



Слика 1. Хајгенсов принцип дифракције таласа



Слика 2. Интерференција

Уколико се направе два иста отвора на препреци на коју наилази талас, сада имамо два секундарна извора истог таласа, доћи ће до нове физичке појаве која се назива интерференција. Интерференција представља узајамно деловање таласа (слагање таласа) чији резултат може бити њихово слабљење, појачавање или уништење (слика 2). Томас Јанг (*Thomas Young*) је извео експеримент 1803. године демонстрирајући интерференцију таласа на два блиска отвора. Овим ексериментом се дошло до закључка да се светлост простире као талас. То је било насупрот многим тврдњама да се светлост састоји од честица коју су заступали научници тога времена. Такође, Огуст Жан Френел (*Augustin-Jean Fresnel*) објављује радове 1815. и 1818. године везане за дифракцију сунчеве светлости и износи потребне једначине које су темељно описивале појаву дифракције.

С обзиром да ћемо у раду посматрати дифракцију редгенских зрака на кристалу, прво ћемо се упознати са општим појмовима у вези са рендгенским зрацима и кристалима.

1. Рендгенски зраци. Основне особине

Рендгенски или Х-зраци су електромагнетне природе и део су електромагнетног спектра мале таласне дужине, реда величине 10^{-10} m. Добили су назив по свом проналазачу Вилхему Конраду Рендгену. Простиру се брзином светлости и крећу се у простору праволинијски. Енергија Х зрачења је директно пропорционална фреквенцији (*v*) а обрнуто пропорционална таласној дужини (λ). Већ до сада смо видели да се може успоставити однос између енергије и таласне дужине зрачења на следећи начин:

$$E_x = \frac{hc}{\lambda}$$

Простирујући се праволинијски, интензитет Х зрачење опада са квадратом растојања. Ако растојање порасте 2 пута, интензитет зрачења опадне 4 пута, услед дивергенције зрачног снопа.

Х зраци имају особину да јонизују материју кроз коју пролазе па се стога и користи термин јонизујуће зрачење. Пролазећи кроз материју, део енергије се предаје материји где се изазивају физичке, хемисјке и биолошке промене (ако је реч о живој материји). Свака енергија се на крају претвара и у топлотну енергију. Ово такође важи и за Х зрачење.

Х зраци изазивају флуоресценцију код многих кристалних супстанци, што се користи у рендгеноскопији, а такође се користе у кристалографији за одређивање структуре самих кристала (Слика 3). Дејство и на фотоемулзију фотографске плоче или филма је добро познато од самог открића овог зрачења.



Слика 3. Приказ дифракције х-зрака на монокристалу ZnS

Биолошко дејство X зрачења открио је и сам Рендген (црвенило коже на месту где су деловали X зраци). Због своје велике енергије зраци су продорни и тако делујући на биолошке системе, мењају њихову грађу, функцију, морфологију, а у довољној количини зрака доводе и до леталног исхода биолошког система. Овим проблемима се бави радиобиологија, а ми ћемо се задржати на физичким карактеристикама и кристалографији.

3. Кристали

3.1. Увод

Кристални минерали или кристали билу су предмет истраживања људи још од давнина. Природа је пуна разних материјала који имају различите физичке и хемијске особине, агрегатна стања, физички облик...

Већ у 17. веку уочено је да су кристали формирани правилним понављањем идентичних елементарних делова, односно, да правилан спољашњи облик упућује на правилну унутрашњу структуру. Прве идеје о томе дао је Роберт Хук (*Robert Hooke*) у делу "Микрографија". Рене Жист Хај (*L'abbé René Just Haüy*) је почетком 18. века објаснио да је периодични распоред идентичних делића узрок чињеници да се одсечци на осама у простору код кристала односе као цели бројеви. Тиме је, уз закон о сталним угловима између одређених пљосни конкретног кристала који је открио Нилс Стено (*Nicolas Steno*) још 1669. године, постављен темељ кристалографији као науци. Међутим, као оснивач кристалографије сматра се Ром де Лил (*Jean-Baptiste Louis Romé de L'Isle*) који је 1783. године публиковао први систематски курс из ове области. [2]

Реч кристал потиче од грчке речи "*кри́отаλλоς*" која значи "чист лед". Једна од дефиниција коју је дефинисао Хук каже да је чврсто тело она супстанца у којој су атоми, јони или молекули распоређени у виду просторне решетке у кристалу. Код кристала сматрамо просторну уређеност градивних елемената у сва три просторна правца. Градивни елементи у кристалу могу бити атоми, јони, молекули, група атома или молекула па чак и њихова комбинација.

Градивни елемент се назива "мотив", а да бисмо описали комплетан кристал морамо да знамо дужине и правце просторних вектора a, \vec{b} и \vec{c} који описују понављање мотива у простору. Ако посматрамо један мотив, нпр. атом, и затим вршимо транслацију у правцу два вектора \vec{a} и \vec{b} добићемо правилан распоред у равни коју граде вектрори \vec{a} и \vec{b} . Ако бисмо кроз сваки низ атома-тачака повукли праву, добили бисмо кристалну мрежу. Ако сада на ту раван додамо нормалу, и за одређени јединични вектор \vec{c}

извршимо транслацију полазног мотива, добићемо просторну формацију тачака које се називају кристална решетка (слика 4), а паралелопипед са најмањом запремином "јединична ћелија".





Слика 4. Положај атома кристалне решетке дијаманта

Слика 5. 2D приказ изградње кристала

Кристална решетка је замишљена творевина, јер је реални структурни мотив замењен тачкама које су бездимензионе. Положај тачака кристалне решетке не мора да се подудара са положајем структурног мотива, што се види на слици 5. Јединична (елементарна) ћелија је замишљени паралелопипед који садржи бар један структурни мотив. Слагањем тих паралелопипеда у простору изграђује се читава структура. Може се рећи да јединична ћелија представља најмањи могући елемент запремине који има потпуну симетрију целе структуре. [1]

Ивице елементарне ћелије *a, b и c* се поклапају са просторним правцима кристала *x, y и z*, па се стога називају и кристалографске осе које се подударају са вектором транслације елементарне ћелије. Стога дефинишемо јединичне векторе \vec{a} , \vec{b} и \vec{c} , као и равни које граде ти вектори и називамо их пљосни кристала. Елементарна ћелија са својим координатним почетком донекле може бити произвољна.Можемо разликовати 5 различитих избора основа елементарне ћелије. Свих 5 елементарних ћелија задовољавају принцип најмање запремине док је симетрија елементарне ћелије јако важна јер на тај начин добијамо симетрију целог кристала при чему пљосни ћелије треба да буду паралелни елементима симетрије. Предност у бирању елементарних ћелија имају оне код којих су осе ортогоналне, са мањом запремином и највишом симетријом.

За једнозначно означавање структурних мотива у елементарној ћелији користимо кристалографски координатни систем, који не мора увек бити ортогоналан, са центром у тачки са највећом симетријом. Ако координате атома означимо са *p*, *q* и *r* дефинишемо фракционе координате које се користе у кристалографији, а које представљају однос координате атома и дужине одговарајуће осе и обележавају се са *x*, *y* и *z*. Атом који се налази у исходишту има координату (0,0,0) атоми који се налазе на координатеним осама две координате 0, док атоми који се налазе на пљоснима ћелије имају једну координату 0.

С обзиром да је $x = \frac{p}{a}$ $y = \frac{q}{b}$ $z = \frac{r}{c}$, могући распон координата за остале атоме у посматраној елементарној ћелији је од 0 до 1.

Избор елементарне ћелије са одговарајућим симетријама доводи до чињенице да се све транслационе решетке могу поделити у седам основних кристалографских система. Системи се међусобно разликују што је условљено постојањем одређених симетрија елемената у свакој класи. У табели 1 дати су кристалографски системи са метриком.

Назив система	Однос периода	Однос углова
Кубни (тесерални)	a = b = c	$\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$
Тетрагонални	a = b ≠ c	$\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$
Орторомбични	a≠ b ≠ c	$\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$
Мониклинични	a≠b≠c	$\alpha = \gamma = 90^{\circ} \neq \beta$
Триклинични	a≠b≠c	α ≠ β ≠ γ ≠ 90°
Хексагонални	a = b ≠ c	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Тригонални (ромбоедрални)	a = b = c	α = β = γ ≠ 90° < 120°

Табела 1. Одос периода и углова у основним кристалографским системима

3.2. Бравеове решетке

Бравеове решетке (Auguste Bravais) настају као резултат комбинације кристалних система и могућих транслација структурног мотива. Најједноставније решетке називају се примитивне решетке и означавају се словом Р. Изузетак је само примитивна ромбоедарска решетка која се обележава словом R. Код њих се транслација врши искључиво за дужину кристалографске осе, а тачке решетке налазе се само на рогљевима јединичне ћелије. Свака тачка на рогљу истовремено је тачка 8 суседних јединичних ћелија и зато свакој Р- решетки укупно гледано припада само једна тачка. Решетке код којих се транслација врши за половину дужине једне или више оса су центриране решетке. Ове решетке се могу схватити као комбинација најмање две идентичне примитивне решетке које су померене једна у односу на другу. Том операцијом померају се и структурни мотив и сви елементи симетрије. Зависно од избора вектора транслације овакве решетке могу бити пљосно или површински центриране (F), базно центриране (C) и запремински центриране (I). Свакој центрираној решетки припада више од једне тачке решетке. Постоје 7 примитивних и 7 центрираних решетки, што чини укупно 14 Бравеових решетки приказаних на слици 6. [1]



Слика 6. Бравеове решетке

3.3. Милерови индекси и реципрочна решетка

Битна особина код кристалне решетке, коју ћемо касније користити у дифракцији, је да се кроз решетку могу поставити различите еквидистантне равни. Оне могу бити у произвољним правцима. Растојање између двеју суседних равни истог низа означава се са *d* и назива се међупљосно растојање и карактеристично је за одређену кристалну структуру. Равни решетке се обележавају тачкама *h, k* и *I* које представљају целе бројеве који се дефинишу као реципрочне вредности одсечка датих равни са кристалографским осама и могу се дефинисати још као Милерови (*Kelly Miller*) индекси, (*h k I*).

Треба обратити на пожњу да Милерови индекси могу бити и негативни, а ако раван прави одсечак у бесконачности, то значи да је та раван паралелна датој

кристалографској оси и индекс је 0. На слици 7. можемо видети три примера кристалографских равни са одговарајућим Милеровим индексима.



Да бисмо спознали кристалну структуру, коју не можемо директно видети, користимо се дифракцијом. О самој методи биће разматрано у наредним поглављима. Такође, за то се показала корисном конструкција једне друге решетке која се назива реципрочна решетка. Да бисмо њу дефинисали морамо прво дефинисати реципрочан простор. Нека је одабрна кристалографски систем $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$. Одговарајући систем реципрочног простора се дефинише као простор \Re^3 с координатним системом одређеним осама $(\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*)$. Реципрочна решетка је скуп свих тачака простора \Re^3 који чине осе \vec{a}^* , \vec{b}^* и \vec{c}^* и са истим координатним почетком као и права решетка такође са целобројним координатама.

У реципрочној решетки можемо поред реципрочних оса \vec{a}^* , \vec{b}^* и \vec{c}^* дефинисати и реципрочне углове $\alpha * \beta *$ и $\chi *$ који граде реципрочну јединичну ћелију. Облик и величина реципрочне јединичне ћелије зависе само од облика и величине јединичне ћелије кристала. Кристалне осе и реципрочне осе имају исти правац само ако су кристалне осе ортогоналне док су њихове дужине у општем случају различите.

4. Дифракција рендгенских зрака на кристалима

Почетком прошлог века, када је откривено рендгенско зрачење многи научници су вршили експерименте и тражили примену рендгенских зрака. Један од њих, Макс Лауе (*Max von Laue*) се истакао у својим истраживањима и закључио да би на уређеној кристалној решетки требало очекивати позитивну интерференцију рендгенских зрака. Одмах потом приступило се експерименту и као кристал послужио је бакар сулфат који је стављен на пут Х- зрацима, а иза се налазила фотографска плоча. На плочи су се поред упадљивог трага директног снопа регистровале и тачке скренуте са праволинијске путање. Био је то први експеримент интерференције Х- зрака и Лауе је 1914. године добио Нобелову награду. [2]

4.1. Дифракција Х-зрака

Да би дошло до дифракције Х зрака основни услов који треба испунити јесте да таласна дужина зрачења и димензије решетке буду блиске. Овај услов је задовољен јер рендгенски зраци имају таласну дужину око 1 Å, док су међупљосна растојања *d* кристалне решетке реда величине **1-10** Å. Приликом проласка рендгенског зрака кроз кристал, атоми, јони или молекули почињу да делују као нови, секундарни извори зрачења. Долази до тзв. расејања зрака и њихове интеракције, при чему се део таласа појачава, а део слаби, па чак и нестаје тј. поништава се. Као што смо већ раније напоменули та појава се назива дифракција и постоје два начина објашњавања овог феномена: Брагов закон и Лауеови услови за дифракцију.

4.1.1. Брагов закон

Посматрајмо кристалну решетку у две димензије као на слици 8. Видећемо еквидистантне равни који за рендгенско зрачење делују као полупропусна огледала. На слици су приказана три паралелна зрака који падају на суседне равни кристала под углом *θ*. Да би рефлектовани таласи у тачкама С и Н били у фази, путна разлика EFG мора бити целобројни умножак таласне дужине рендгенског зрачења. Из сличности троуглова и синусне теореме добијамо следеће изразе:

$n\lambda = 2d\sin\theta$

Овај израз је познат као Брагов закон или Брагова једначина где је n цео број, λ таласна дужина X зрака, d растојање између суседних равни у кристалу, θ упадни угао снопа X зрака. [3]



Слика 8. Брагов закон помоћу кристалографских равни

4.1.2. Лауеови услови за дифракцију

Ако рендгенски зраци падају на низ тачака једнаког међусобног растојања, долазиће до расипања у свим правцима. Међутим, због појаве интерференције, дођи ће до појачавања и слабљења зрака на одређеним правцима који су настали расипањем на низу тачака. На слици 9. видимо хипотетички једнодимензиони кристал; слично као код Браговог закона можемо наћи релацију која повезује међуатомско растојање, а таласну дужину и угао дифракције:



Слика 9. Дифракција на низу тачака

Како је дифракција присутна у сва три правца, са сваког низа тачака, добијамо дифрактовани сноп конусног облика. Дакле, добијамо три једначине које се још и називају Лауеове једначине или Лауеови услови за дифракцију:

$$g\sin(\varphi_0-\varphi)=n\lambda$$
;

Могу се још написати и као:

 $a_{1} \sin \varphi_{1} = n\lambda$ $a_{2} \sin \varphi_{2} = n\lambda$ $a_{3} \sin \varphi_{3} = n\lambda$

и при томе свака представља услов за дифракцију на једном низу атома у одређеном правцу. Да бисмо добили дифракциону слику, морају истовремено бити задовољене све три једначине, слика 10.



Слика 10. Формирање конуса дифрактованог зрака

4.2. Интензитет дифракције. Општи фактори од значаја за интензитет

Битна особина рендгенског зрачања у кристалографији јесте сам интензитет дифрактованог снопа зрачења. На њега директно утиче сама структура кристалне решетке, али и низ других фактора. Зависност интензитета дифракције не само да је релативно сложена у односу на велики број параметара који на њега утичу, него је у односу на неке битне величине само имплицитна, што ствара додатне тешкоће.

Међутим, тек прецизно одређивање интензитета и сложена аналитичка обрада омогућује најсуптилније коришћење ове методе у циљу веома прецизних одређивања структурних детаља у конкретним материјалима, те су разумљиви напори и потреба да се питање интензитета до краја аналитички обради.

Свакако да се интензитет мора везати за одређени дифракциони рефлекс, који је последица дифракције са неке конкретне кристалографске равни дефинисане Милеровим индексима (*hkl*), тако да се они јављају као индикативни параметар. Уобичајено је да се интензитет са неке равни обележава као I(*hkl*), што је аналитички описано релацијом:

$$I(hkl) = KMAL_p \left| F_c(hkl) \right|^2$$

Где је: К фактор нормирања

- А фактор апсорпције
- М фактор мултиплицитета
- L_p Лоренц-поларизациони фактор
- $|F_c(hkl)|$ амплитуда структурног фактора

Фактор нормирања (К) је константа пропорционалности која омогућава међусобно поређење интензитета дифракције код датог кристала, независно од услова конкретних мерења. Наиме, у сваком конкретном експерименту, у зависности од свих експерименталних услова, као и од величине кристала, апсолутне вредности интензитета дифракције се по правилу значајно разликују. Фактор К се према усвојеној конвенцији одређује тако да најинтензивнија рефлексија има вредност 100. Множењем са тако добијеним фактором утврђују се вредности интензитета за све дифракционе тачке које морају бити мање од 100.

Фактор мултиплицитета (*M*) представља корекцију на могућност да се у случају виших симетрија на истом месту појави дифракциона тачка која је последица рефлексије од различитих равни. Код метода које користе обртање узорка у циљу остваривања услова за позитивну интерференцију, или код метода које користе поликристалне узорке, могуће је да због појаве рефлексије на истом месту од симетријски еквивалентних равни, рачунат интензитет треба множити са одговарајућим целобројним фактором да би се могао поредити са одговарајућом експерименталном вредношћу. Фактор апсорпције (A) везан је за карактеристике методе снимања интензитета, атомског састава и облика узорка. Треба истаћи да на апсорпцију битно утичу атоми са већим редним бројем у периодном систему, тако да у случају када они нису заступљени у узорку, по правилу корекција на ову величину није ни потребна.

Лоренц-поларизациони фактор (*L*_{*p*}) је по свом узорку сложен, јер је последица две независне појаве. Изражава се као јединствен из разлога што су оба фактора последица методе и угла дифракције, па је логично да се обједине у јединствен аналитички израз. [4]

Структурни фактор ћемо образложити детаљније.

4.2.1. Структурни фактор

Структурни фактор неког расејавајућег објекта $F(\vec{S})$ дефинише се као однос резултујуће комплексне амплитуде таласа расејаног овим објектом и комплексне амплитуде таласа који би расејавао у том правцу један електрон када би се налазио у координатном почетку.

Нека је дат модел који се састоји само од једног електрона који је на растојању \vec{r} у односу на координатни почетак. Ако искористимо израз за електромагнетни талас који емитује електрон из координатног почетка у правцу јединичног вектора \vec{s}

$$E(\vec{R},t) = \tilde{E}_0(\vec{R}) \exp(2\pi i (\nu t - \frac{\vec{s} \cdot \vec{R}}{\lambda}))$$

Можемо добити израз за талас који расејава овај електрон:

$$E'(\vec{R},t) = \tilde{E}_0(\vec{R}) \exp(2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}) \exp(2\pi i (\nu t - \frac{\vec{s} \cdot \vec{R}}{\lambda}))$$

где \vec{S} представља вектор расејања који зависи од упадног угла θ , $\left|\vec{S}\right| = \frac{2\sin\theta}{\lambda}$.

Однос амплитуде овог таласа и таласа који расејава електрон који би се налазио у координатном почетку представља структурни фактор овог модела и дат је изразом:

$$F(\vec{S}) = \exp(2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r})$$

Атомски фактор расејања је функција која показује амплитуду рендгенских зрака расутих са појединачних атома и има ознаку f, уз индекс којим се означава тип атома, на пример f_{Cu} , f_F итд. Атомски фактор расејања дефинише се као ефикасност расипања датог атома у посматраном правцу, што се може приказати односом амплитуда:

$$f = \frac{A_A}{A_E}$$

где је A_A амплитуда таласа расутог са једног атома а A_E амплитуда таласа расутог са једног електрона. Атомски фактор расипања назива се понекад и "форм фактор", јер зависи од распореда електрона око атомског језгра, тј. од облика (форме) електронског омотача. [1, 4]

Како у атому имамо више електрона можемо уочити у једном делу простора атома малу запремину dV. Талас расејан овим елементом запреминског наелектрисања у правцу јединичног вектора \vec{s} , имаће амплитуду пропорционалну броју електрона, тј. $\rho(\vec{r})dV$, али ће се разликовати у фази од таласа који би у том правцу расејавао један електрон који би се налазио у центру атома (координатном почетку).

Структурни фактор овог елемента запремине је:

$$F(\vec{S}) = \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}) dV$$

Структурни фактор читавог атома добили бисмо сумирањем структурних фактора свих елемената тј. интеграцијом по читавој запремини:

$$F_a(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}) dV$$
$$F_a(\vec{S}) = 4\pi \int_0^\infty \rho(r) \cdot r^2 \frac{\sin 2\pi Sr}{2\pi Sr} dr = f(S)$$

Из израза вдимо да је f(s) реална величина и као што смо рекли назива се атомски фактор расејања или атомски форм-фактор. [4]

4.3. Одређивање расподеле електронске густине у кристалу

4.3.1. Фуријеова синтеза

Идеални кристални простор карактерише се тродимензионом периодичном грађом која се може приказати хомогеним скупом елементарних ћелија у којима се понавља један исти структурни мотив. Ако се одреди расподела електронске густине у једној од елементаних ћелија, на местима максимума те густине налазиће се атоми који улазе у структуру сваке елементарне ћелије, па би тиме и структура кристала била решена. Како положаји атома у елементарној ћелији могу бити додатно повезани одређеним елементима симетрије, то се при одређивању расподеле електронске густине бира само један део запремине елементарне ћелије и у том делу се одређује расподела електронске густине, што је довољно да се симетријским операцијама може наћи распоред атома у целој елементарној ћелији. Тај део елементарне ћелије се назива асиметрични део. Ако расподелу електронске густине $\rho(\vec{r})$ у елементарној ћелији схватимо као континуирану са максимумима на местима где се налазе центри атома, тада се структурни фактор елементарне ћелије у интегралној форми може записати као:

$$F(\vec{S}) = \int_{V} \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}) dV ,$$

где се интеграција врши по запремини елементарне ћелије.

Из горње релације уочавамо да $F(\vec{S})$ представља Фуријеову трансформацију $\rho(\vec{r})$. Тада је и $\rho(\vec{r})$ инверзна Фуријеова трансформација $F(\vec{S})$, па се може писати:

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \int_{V^*} F(\vec{S}) \exp(-2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}) dV^*,$$

где се интеграција врши по целој запремини реципрочног простора.

Како се у реципрочном простору $F(\vec{S})$ не мења континуирано, већ има вредности различите од нуле само у чворовима реципрочне решетке одређеним са *hkl*, то се интеграција може заменити сумирањем по свим могућим вредностима *hkl* од $-\infty$ до $+\infty$:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} F(hkl) \exp\left[-2\pi i (hx + ky + lz)\right]$$

Овај поступак израчунавања расподеле електронске густине у једној елементарној ћелији помоћу структурних фактора назива се Фуријеова синтеза. Ако се структурни фактор представи у облику:

$$F(hkl) = \left| F(hkl) \cdot \exp[i\alpha(hkl)] \right|$$

Тада се расподела електронске густине може рачунати као:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} F(hkl) \exp\left[-2\pi i \cdot (hx + ky + lz - \alpha(hkl))\right]$$

Уколико кристални простор поседује одређене елементе симетрије, горњи израз се може упростити.[4]

4.3.2. Решавање структуре кристала Фуријеовом анализом.

При решавању структуре кристала, експериментално се могу одредити само модули структурних фактора, док се њихове фазе могу добити неким индиректним разматрањем које ћемо навести у оквиру "фазног проблема".

Ако је на неки начин могуће одредити фракционе координате (изражене у деловима осних јединица) једног или више атома, тада њихове познате положаје можемо искористити за приближно израчунавање структурних фактора као:

$$F_{cal}(hkl) = \sum_{j=1}^{N_{poz}} f_j(hkl) \exp[2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)]$$

Структурни фактор елементарне ћелије кристала може се приказати као збир структурног фактора који потиче од атома са познатим положајима и атома са још непознатим положајима:

$$F_{c}(hkl) = \sum_{j=1}^{N_{poz}} f_{j}(hkl) \exp[2\pi i(hx_{j} + ky_{j} + lz_{j})] + \sum_{N_{poz}+1}^{N} f_{j}(hkl) \exp[2\pi i(hx_{j} + ky_{j} + lz_{j})]$$

Где је N_{poz} број атома са познатим положајима, а N укупан број атома у елементарној ћелији. Поступак израчунавања структурних фактора из познатих положаја атома назива се Фуријеова анализа.

Структурни фактори из претходне релације се могу приказати и као:

$$F_{c}(hkl) = |F(hkl)|_{0} \exp[i\alpha_{poz}(hkl)] + |F(hkl)|_{0} \exp[i\alpha_{nepoz}(hkl)]$$

Модули структурних фактора "познатих" атома биће:

$$|F_{poz}(hkl)| = (F_{rpoz}^2 + F_{ipoz}^2)^{1/2}$$

где су

$$F_{rpoz}^{1} = \sum_{j=1}^{N_{poz}} f_{j} \cdot \cos 2\pi (hx_{j} + ky_{j} + lz_{j})$$
$$F_{ipoz}^{1} = \sum_{j=1}^{N_{poz}} f_{j} \cdot \sin 2\pi (hx_{j} + ky_{j} + lz_{j})$$

А фазе које условљавају "познати" атоми

$$\alpha_{poz}(hkl) = arctg \frac{F_{ipoz}(hkl)}{F_{rpoz}(hkl)}$$

Овако добијене фазе се придруже уз експериментално измерене модуле свих структурних фактора, те на тај начин добијамо скуп приближних вредности структурних фактора. Са овако добијеним приближним вредностима структурних фактора може се израчунати расподела елекстронске густине, у првој апроксимацији (Фуријеова синтеза). Овде треба напоменути да су експерименталне вредности сакупљене у коначном броју

чворова реципрочне решетке, те ће се индекси *hk*l мењати у коначном интервалу, што ће утицати на моћ разлагања и изазвати "грешку због прекида реда".

У тако израчунатој Фуријеовој синтези појавиће се максимуми електронске густине и на неким другим местима, осим у близини оних на којима се налазе "познати" атоми. Ти максимуми се идентификују као нови познати атоми и придружују се раније познатим, а за координате раније одређених атома узимају се оне које даје Фуријеова синтеза у последњем циклусу, те поново рачунамо модуле и фазе структурних фактора. Овако побољшане фазе придружују се експериментално измереним вредностима структурних амплитуда и рачуна нова расподела електронске густине. Овај процес назива се Фуријеутачњавање.

4.3.3. Диферентна Фуријеова анализа

У општем случају кристалографска истраживања подразумевају дифракцију таласа који интерагују са атомима и чије су таласне дужине упоредиве са атомским растојањима у кристалима (10⁻¹⁰ m) и низ метода на основу којих се из дифракционе слике добијају информације о структури.

Као што смо рекли, структурна анализа помоћу дифракције Х-зрака позиције атома одређује се помоћу Фуријеове синтезе, у којој се електронска густина израчунава на основу структурног фактора *F*_{hkl}, на следећи начин:

$$\rho_{xzy} = \frac{1}{V} \sum_{-\infty}^{h=\infty} \sum_{-\infty}^{k=\infty} \sum_{-\infty}^{l=\infty} F_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

 F_{hkl} је комплексан број са амплитудом $|F_{hkl}|$ и фазом α_{hkl} , где само $|F_{hkl}|$ може директно да се мери за сваку рефлексију јер је интензитет сваке рефлексије дат као.

$$I(hkl) = KMAL_p \left| F_{hkl} \right|^2$$

где је К фактор нормирања, А фактор апсорпције, М фактор мултиплицитета, *L*_p Лоренцполаризациони фактор.

Интензитет дифрактованог зрачења, не само да је релативно сложена функција у односу на велики број параметара, него од неких битних физичких величина зависи само имплицитно. Међутим, тек прецизно одређивање интензитета и сложена аналитичка обрада омогућује најсуптилније коришћење дифракционих метода у циљу веома прецизних одређивања структурних детаља.

Одређивање друге компоненте структурног фактора, односно, одређивање фазе, познато је као фазни проблем. Фазни проблем је био решен помоћу директног метода за који су Х. Хауптман и Ј. Карле 1985. године добили Нобелову награду. Када се одреде фазе

структурних фактора, може се Фуријеовом трансформацијом структурних фактора (Фуријеова синтеза) рачунати расподела електронске густине у елементарној ћелији и на основу тога одредити положај свих атома у њој.

Водоникови атоми се локализују у међуфази структурног утачњавања (метода утачњавања биће касније објашњена), односно, када се заврши утачњавање за неводоникове атоме са изотропним температурним факторима и пре почетка утачњавања са анизотропним температурним факторима. Позиције водоникових атома могу бити одређене помоћу диферентне Фуријеове анализе. Ова анализа се састоји у следећем: на основу познатих положаја атома у елементарној ћелији могу се израчунати структурни фактори:

$$F_{cal}(hkl) = |F(hkl)|_{cal} e^{-i\alpha_{cal}(hkl)}$$

а на основу њих Фуријеова синтеза даје електронске густине:

$$\rho_{cal} = \frac{1}{V} \sum_{-\infty}^{h=\infty} \sum_{-\infty}^{k=\infty} \sum_{-\infty}^{l=\infty} F_{cal}(hkl) e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

Ако се сада израчунате фазе ρ_{cal} припишу измереним модулима структурних фактора добиће се "опажени" (*observed*) структурни фактори:

$$F_{obs}(hkl) = \left| F(hkl) \right|_0 e^{-i\alpha_{cal}(hkl)}$$

Помоћу ових структурних фактора може се израчунати "опажена" електронска густина:

$$\rho_{obs} = \frac{1}{V} \sum_{-\infty}^{h=\infty} \sum_{-\infty}^{k=\infty} \sum_{-\infty}^{l=\infty} F_{obs}(hkl) e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

Одузимањем ho_{cal} од ho_{obs} добијамо функцију $\Delta
ho$:

$$\Delta \rho = \rho_{obs} - \rho_{cal} = \frac{1}{V} \sum_{-\infty}^{h=\infty} \sum_{-\infty}^{k=\infty} \sum_{-\infty}^{l=\infty} \left(F_{obs} - F_{cal} \right) e^{-2\pi i \left(hx + ky + lz\right)}$$

Диферентне мапе $\Delta \rho(xyz)$ имају следеће особине:

- 1. за тачно одређен положај атома $\varDelta
 ho$ ће бити приближно нула
- 2. за погрешно лоциран атом у диферентној мапи ће се појавити негативна вредност за $\Delta \rho$
- 3. ако у претпостављеној структури није предвиђен атом који у реалној структури постоји, на том месту појавиће се изразити максимум *∆р*

Из расподеле рачунате у диферентној Фуријеовој синтези могу се одредити веома мале разлике у електронској густини, па се због тога ова метода може користити за одређивање положаја атома водоника. Положај водониковог атома одређује се из диферентне мапе као максимум у близини неводоникових атома. Овако добијене позиције водоникових атома се затим укључују у утачњавање, али се водоници утачњавају са изотропним температурним факторима.

Одређивање положаја водоникових атома помоћу диферентне мапе је тешко због извесних недостатака. Пре свега често се дешава да се положај неког од водоникових атома не може одредити јер је његов максимум маскиран "таласањем" електронске густине услед присуства тешких атома. Међутим, најважнији недостатак одређивања положаја Х-атома из диферентне мапе је грешка коју у себи носи метода дифракције Хзрака на кристалу. Овом се методом одређује положај електронског облака атома који је код тежих атома мање-више сферно симетричан, па се његов центар поклапа са положајем језгра датог атома. Код водоника постоји само један електрон који "пулсира" око везе водоника са тежим атомом, тако да је центар електронског облака померен ка том тежем атому, па се положај водониковог атома овом методом не одређује прецизно. Овај проблем се решава нормализацијом дужине водоничне везе.

Често се за одређивање положаја водоникових атома користи метода генерисања. Проучавање великог броја молекула у гасовитом стању дало је бројне податке о везама С–Н, О–Н, N–Н итд., на основу којих се тачно знају њихове дужине и вредности валентних углова. Кристално поље, које не утиче на дужине веза и само незнатно мења вредности валентних углова, неће битно променити положаје водоника када се једињење налази у кристалном стању. Тако се методом генерисања могу добити прецизни положаји водоникових атома у молекулу. [5]

4.3.4. Утачњавање структуре. Метода најмањих квадрата

Оно што добијамо Фуријеовом синтезом или диферентном Фуријеовом синтезом је приближни модел молекуларне и кристалне структуре. Његова приближност се огледа у томе што још увек постоје значајне разлике између неких измерених амплитуда структурних фактора $|F|_0$ и оних израчунатих $|F|_c$ на основу фаза структурних фактора.

Наиме, након одређивања фаза структурних фактора, оне се придружују уз експериментално измерене модуле свих структурних фактора, те на тај начин добијамо скуп приближних вредности структурних фактора $|F|_c$. Са овако добијеним приближним вредностима структурних фактора може се рачунати расподела електронске густине у првој апроксимацији. У тако израчунатој Фуријеовој синтези појавиће се максимуми електронске густине и на неким другим местима осим у близини оних на којима се налазе "познати" атоми. Ти максимуми се идентификују као нови "познати" атоми и придружују

се раније "познатим", а за координате раније одређених атома узимају се оне које даје Фуријеова синтеза у последњем циклусу, те поново рачунамо модуле и фазе структурних фактора. Овако побољшане фазе се придружују експериментално измереним вредностима структурних амплитуда и рачуна нова расподела електронске густине. Овај процес се назива Фурије - утачњавање.

Да би се побољшало слагање између измерених и израчунатих вредности структурних амплитуда, односно завршно утачнио модел структуре, користимо методу најмањих квадрата.

Према методу најмањих квадрата најбоље слагање између измерених и израчунатих вредности структурних амплитуда добиће се за оне вредности параметара за које је сума квадрата разлика измерених и израчунатих вредности за сва мерења најмања.

$$Q = \sum_{hkl} w(hkl) \left(\left| F \right|_0 - \left| F \right|_c \right)^2 ,$$

Где *w(hkl)* представља статистичку тежину мерења, која исказује поузданост мерења рефлекса са индексима *hkl*. [5]

4.3.5. Фактор поузданости R

У циљу квалитетне процене степена слагања добијеног модела кристалне структуре са стварном структуром, врши се поређење измерених амплитуда структурних фактора $\left|F\right|_{c}$ рачунатих помоћу познатих атома и њихових положаја. Као мера слагања добијеног модела и стварне структуре дефинише се величина:

$$R = \frac{\sum \left\| F \right\|_0 - \left| F \right|_c}{\sum \left| F \right|_0},$$

где се сумирање врши по свим индексима измерених дифракционих максимума. R се назива фактор поузданости и што је мањи, то је модел ближи стварној структури која је извршила расејање монохроматског зрачења и дала измерене вредности структурног фактора $|F|_{a}$.

Упоредо са вредношћу R рачуна се и "отежани" фактор поузданости *R*_w према релацији:

$$R_{w} = \left(\frac{\sum w \left(|F|_{0} - |F|_{c}\right)^{2}}{\sum w |F|_{0}^{2}}\right)^{1/2}$$

,

где је *w* тежински коефицијент мерења структурног фактора. Он исказује поузданост извршеног мерења и једнак је :

$$w = \frac{1}{\sigma^2}$$
,

дге је σ стандардна девијација.

Сматра се да је структура задовољавајуће решена ако се координате и анизотропни температурни фактори тако утачне да је *R* < 10%, али прихватљива вредност за *R* зависи и од структуре.

5. Стероидни хормони

Стероидни хормони припадају групи сложених липидних молекула. Деле се на кортикостероиде које производи кора надбубрежне жлезде и полне хормоне које производе полне жлезде (код жена јајници, код мушкараца тестиси), постељица у трудноћи, а сматра се да мале количине продукују и ћелије мозга [16].

Основну структуру стероида представљају угљеникови атоми повезани у три шесточлана и један петочлани прстен (слика 11).



Слика 11. Основна структура стероида (лево). Структура естрадиола(десно)

Производња стероидних хормона у одговарајућим ткивима почиње од молекула холестерола. Холестерол се углавном сматра "лошим" молекулом због везе између повећаног нивоа у крви (хиперхолестеролемије) и ризика од настанка кардиоваскуларних болести. Но, холестерол је истовремено нужан састојак свих наших ћелија, без којег ћелије не би могле преживети па ни производити тако важне супстанце као што су стероидни хормони, жучне киселине (које омогућују пробаву масти) и витамин Д. Холестерол даје интегритет и чврстину ћелијској мембрани. Ћелијама је, дакле, на располагању холестерол који потиче из три различита извора. Један су липопротеини плазме (код човека липопротеини мале густине – LDL), други су липидне капи где је холестерол похрањен у облику холестерол естара, а трећи и највећи извор холестерола је његова биосинтеза из ацетил-коензима А (acetil-CoA). Холестерол (27С) се транспортује до митохондрија где се одиграва кључна реакција у процесу стероидогенезе, тако што се део бочног ланца холестерола отцепљује уз настанак прегненолона (21С) [17] (слика 12). Настали прегненолон се транспортује у цитоплазму где се врши његова даља конверзија у прогестерон. Прогестерон даље учествује у синтези хормона коре надбубрежне жлезде (минерало и глико-кортикоида: кортизол, алдостерон, као и андрогена), хормона оваријума (естрогена: естрадиол, естрон) и хормона тестиса (андрогена: тестостерон и

други њему слични, нпр. андростендион, дехидроепиандростерон, дихидротестостерон) (слика 12).

Стероидни хормони се, дакле, стварају у врло сложеним низом хемијских реакција од холестерола, преко прегненолона, који је први претходник свих стероидних хормона, до прогестерона. Прогестерон је познат као женски полни хормон. Ипак, од њега настају хормони коре надбубрежне жлезде и полни хормони. Занимљиво је да од прогестерона, односно прегненолона, настају и мушки и женски полни хормони, а још је занимљивије да естрогени заправо настају хемијском реакцијом из тестостерона. То заправо значи да и мушкарци и жене у организму имају способност производње и мушких и женских полних хормона, али постоји полна разлика у количини произведених хормона.



Слика 12. Шематски приказ биосинтезе андрогена где су словима поред стрелица обележени ензими који катализују приказане реакције. Ензими који учествују у процесу стероидогенезе су: **a**) P450scc; **b**) 3βHSD; **c**) 21-хидросксилаза; **d**) 11β-хидроксилаза, 18-хидроксилаза, 18-оксидаза; **e**) P450c17; **f**) 17βHSD; **g**) P450аром; **h**) 5α-редуктаза; **i**) 11β-хидроксилаза.

За трансформацију холестерола у андрогене хормоне одговорни су следећи ензими: цитохром P450_{scc}, 3 β HSD, цитохром P450c17 i 17 β HSD док је ензим 5 α -редуктаза (5 α R) одговоран за превођење тестостерона у дихидротестостерон.

Цитохром P450_{scc} (P450_{side chain cleveage}), иначе лоциран у унутрашњој страни митохондрија, одговоран је за иницирање стероидогенезе на тај начин што од њега зависи раскидање бочног ланца холестерола [18]. У току овог процеса врши се постепена хидроксилација у положајима C22 и C20, а затим и раскидање везе између ова два атома деловањем ензима цитохром P450_{scc} [19]. Настали прегненолон се транспортује у цитоплазму где се врши његова даља конверзија у прогестерон уз учешће Зβ-хидроксистероид дехидрогенезе/ Δ^5 , Δ^4 изомеразе (ЗβHSD [20]. Прво се C3 хидроксилна група прегненолона оксидује у C3 кето групу, а затим се C5-C6 двострука веза премешта на C4-C5, при чему настаје прогестерон. Прогестерон даље учествује у синтези хормона коре надбубрежне жлезде (минерало-и глико-кортикоида, као и андрогена), хормона оваријума (естрогена) и хормона тестиса (андрогена).

Прелазак прогестерона у андрогене као 19С-стероиде подразумева хидроксилацију на С17, а затим оцепљење С20 и С21 ланца, где су обе реакције катализоване ензимом цитохром Р450 17α-хидроксилазом (Р450с17) [19].

Даљи ток стероидогенезе може бити остварен преко тзв. Δ^5 (5-ен-3 β -хидрокси) пута или Δ^4 (4-ен-3-оксо) путем. У хуманим тестисима доминантан је Δ^5 пут [21]. Пут Δ^5 подразумева настанак 17 α -хидрокси прегненолона, а затим дехидроепиандростерона (DEHA) који се каталитичким дејством ензима 17 β -хидроксистероид дехидрогеназе (17 β HSD) дехидрогенује у 5-андростендиол. Из 5-андростендиола дехидрогенацијом и изомерацијом, уз каталитичко дејство 3 β HSD, настаје тестостерон. Затим, ензим 5 α редуктаза омогућава да тестостеронон пређе у дихидротестостерон (DHT). Према Δ^4 путу дехидроепиандростерон прелази у андростендион дејством ензима 3 β HSD, а затим андростендион у тестостерон под утицајем ензима 17 β HSD. У даљој стероидогенези, тестостерон се трансформише у естрадиол, андростендион у естрон под утицајем ензима P450_{arom} [22].

5.1. Естрогени: структура и везивање за рецептор

Естрогени су група стероидних једињења који примарно функционишу као женски полни хормони. Естрогене луче јајници. С обзиром да се јајници састоје из две ендокрине творевине, Графових фоликлула и жутог тела, прецизније је рећи да Графови фоликули луче естрогене док жуто тело лучи прогестерон. Стимулацијом синтезе протеина естрогени подстичу сазревање фоликула, овоцитогенезу, развитак млечних каналића у млечним жлездама, као и развитак примарних и секундарних полних особина које карактеришу женски пол. Естрогени стимулишу развој вагине, утеруса, пролиферативни раст ендометријума као и раст утериних жлезда. Они утичу на развој и грађу костура (посебно изглед карлице). Распоред длакавости женског типа, развој млечних жлезда, итд. Јетра је главни орган у којем се врше метаболичке трансформације естрогена. Требало би нагласити да естрогени нису искључиво женски хормони. Они се синтетишу и у организму мушкараца, али у много мањој мери. Естрогени хормони представљају један од фактора који омогућава нормалну циркулацију крви захваљујући њиховом вазодилататорском ефекту (ширење крвних судова). Поред тога утичу на смањење концентрације липида у крви, а одговорни су и за задржавање натријума, калцијума и фосфора у органима.

Основни естрогени хормони су: естрол, естрадиол и естрон (слика 13). Од пубертета до менопаузе примарни естроген је 17β-естрадиол. У менопаузи јајници престају да продукују естрогене. Тада секундарни извори естрогена, као што су надбубрежна жлезда, адипозно ткиво, мишићи, кожа и јетра постају посебно важни. Пошто се дојке углавном састоје од масног и жлезданог ткива, оне такође продукују естрогене. У периоду менопаузе у телу жене главни естроген постаје естрон.

Синтеза естрогена, као и свих стероидних хормона, почиње од холестерола. Холестерол се трансформише у андростендион и тестостерон (слика 12). Кључна фаза у биосинтези естрогена је превођење ових адреналних андрогена у естрон и естрадиол. Овај последњи корак синтезе катализује ензим цитохром Р450 ароматаза (слика 12). Естрадиол настаје из тестостерона, а естрон из андростедиона.



Слика 13. Основни естрогени хормони: естрол (а), естрадиол (b), естрон (с).

Да би дошло до биолошког ефекта, хормон мора прво да се веже за специфичан протеин циљне ћелије који називамо рецептором, те рецептор мора да има високу специфичност за одређени хормон. Рецептори за различите хормоне налазе се на површини ћелијске мембране, специфични су за већину протеинских и пептидних хормона и катехоламине, затим се налазе у цитоплазми, али и у једру се налазе рецептори за стероидне хормоне.

Хормони који делују преко мембранских рецептора углавном делују на активност ензима у ћелији који су одговорни за синтезу или лизу различитих продуката. Биолошки

ефекти хормона зависе од њиховог афинитета и способности везивања за рецепторе, као и од концентрације слободних хормона у плазми.

Рејнод са сарадницима [23] је упоредио афинитет везивања 104 стероида за пет различитих рецептора: естрогени рецептор (ЕР) из утеруса миша, прогестински рецептор (ПР) из утеруса зеца, андрогени рецептор (АР) из простате пацова, гликокортикоидни рецептор (ГР) из јетре пацова и минералокортикоидни рецептор (МР) из бубрега пацова. Утврђено је да постоји знатна компетиција у везивању између многих стероида који се снажно везују за ПР, АР, ГР и МР рецепторе. Насупрот овоме, једињења са високим афинитетом према овим рецепторима показују низак или никакав афинитет према естрогеном рецептору. Основна структурна разлика између стероида који се добро везују за естрогени рецептор и оних који се добро везују за остале рецепторе је у томе да први без изузетка садрже фенилни A прстен.

Испитивање структура једињења која имају афинитет за естрогене, прогестинске и кортикоидне рецепторе довело је до закључка да је везивање између рецептора и ових стероида примарно резултат интеракције између рецептора и стероидног А прстена [58]. Слика 14. илуструје поклапање фенилних А прстенова за шест различитих стероидних једињења и показује да скоро сва ова једињења могу да се вежу за естрогени рецептор. Међутим, биолошка активност естрогена, прогестина и кортикоида је контролисана структурним карактеристикама D прстена. [24]



Слика 14. Приказ суперпозиције фенилних прстенова шест молекула који се везују за естрогени рецептор. Ова илустрација сугерише да се разлике у структури D прстена и његовој оријентацији у односу на везивање за рецептор толеришу [58]

Антагонисти који се компетитивно везују за естрогене рецепторе имају композицију и конформацију А прстена потребну за везивање за рецептор, али недостатак функционалних група и конформационих одлика D прстена који стабилишу и омогућавају одговарајуће функције рецептора неопходне за активност. [24]

У пољу молекуларне биологије, нуклеарни рецептори су класа протеина који су присутни у ћелијама и који су одговорни за одговор ћелије на стимулацију стероидним и тироидним хормонима, као и низом других молекула. Након активације, ови рецептори заједно са другим протеинима учествују у регулацији експресије специфичних гена и на тај начин контролишу развиће, хомеостазу и метаболизам организма.

Како стероидни хормони, тако и тироидни, витамин Д и А делују путем врло сличних механизама изазивајући исте опште ефекте, тј. индукцију синтезе РНК и различитих врста протеина. У неким случајевима хормон-рецептор комплекс делује смањујући активност гена, док стабилни комплекс хормон-рецептор понаша се ако активатор који се везује за различите контролне елементе гена. Јако важна особина је да након везивања лиганада рецептори димеризују те долази до транслокације у нуклеус (једро) где ови комплекси делују као транскрипциони фактори. Ови фактори регулишу генску експресију- дакле могу да буду активатори или репресори што ће зависити од целог сплета околности.

Пептидни хормони делују на мембранске рецепторе преко којих остварују своје дејство на више начина. Један од њих је промена пермеабилности мембране везивањем хормона за мембрански рецептор и стварањем комплекса хормон рецептор долази до промена у конфигурацији и конформацији, што доводи до промене пропустљивости ћелијске мембране за различите елементе и супстанце. Или активацијом интрацелуларнх ензима везивањем хормона за мембрански рецептор.

Код стероидних рецептора хормон везујући домен утиче на активност рецептора, а сама активација назива се лиганд- везујућа активација. Сви стероидни рецептори су у неактивном стању, а везивањем хормона се активирају и добијају много већи афинитет за везивање са ДНК, што је кључно јер само тако могу да делују као транскрипциони фактори.

6. Експериментални део

У експериметалном делу овог рада и у оквиру дискусије биће дати резултати:

- 1. рендгенске структурне анализе
- 2. анализе водоничних веза и
- 3. испитивања релативног афинитета везивања

за једињење З-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил (5).

6.1. Синтеза

Полазећи од естрона, добијен је у неколико синтетских фаза 3-бензилокси-17хидрокси-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил (1). Ова супстанца је кључни интермедијер у синтезама других 17-супституисаних 16,17-секоестронских деривата. Због своје антиестрогене активности међу ситетисаним једињењима (слика 15) се као најинтересантнији показао **3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16нитрил** (5) [8, 9]. Због тога је једињење 5 било интересантно за експеримент рендгенске структурне анализе да би се недвосмислено одредила његова структура и тако до краја разјаснила и његова биолошка активност.



Слика 15. Синтеза 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрила

6.2. Рендгенска структурна анализа

6.2.1. Опис апаратуре

Да би се одредила структура неког једињења, односно начин на који су атоми у једињењу повезани један за други као и њихов распоред у тродимензионом простору, потребно је дато једињење у облику кристала (монокристала) изложити снопу рендгенских зрака. У контакту рендгенских зрака, чије су таласне дужине упоредиве са атомским растојањима у кристалима (10⁻¹⁰ m) и електронским облацима атома у молекулима испитиваног кристала, долази до дифракције рендгенских зрака. Ова дифракциона слика се затим реконструише у низу компјутерских техника и на основу резултата ових анализа добија се тродимензиони распоред атома у молекулу. [6]

Дифрактометар Gemini Xcalibur је уређај високе технологије намењен рендгенском испитивању првенствено монокристалних, али и прашкастих кристалних узорака у циљу проналажења кристалне структуре органских, неорганских и органо-металних једињења, као и минералних и биолошких узорака. Урећај који се користи на Департману за физику у Новом Саду може користити рендгенско зрачење две различите таласне дужине које се генерише са две рендгенске цеви (бакарне и молибденске) и ССD камеру нове генерације Saphire CCD као детектор на кристалним узорцима расејаног зрачења. Узорци се монтирају на четворо-осни капа-геометријски гониометар који обезбеђује оријентацију узорака у широком опсегу углова. Уређај је опремљен оптичким микроскопом са видео камером која слику шаље на монитор унутар самог уређаја, као и на монитор рачунара којим се управља комплетним системом, тако да је могуће пратити узорак у било ком тренутку. По потреби је могуће снимање на ниским температурама (до -183 °C), а постижу се посебним додатком који млаз течног азота усмерава на узорак. Снимање на ниским температурама је погодно због смањених осцилација молекула у кристалној решетки, што резултује тачнијим одређивањем структуре. У саставу инструмента се налазе и два хладњака, са отвореним и полуотвореним системом течног хлађења који одводе топлоту са детектора и рендгенских цеви.



Слика 16. Приказ дифрактометра Gemini Xcalibur:

- 1. Четвороосни Карра геометријски гониометар
- 2. ССD камера (детектор)
- 3. Кућиште са генераторима високог напона
- 4. Носач топа са течним азотом
- 5. Управљачки софтвер инсталиран на рачунарској станици
- 6. Хладњак детектора
- 7. Хладњак рендгенске цеви

Дифрактометар *Gemini Xcalibur* има две рендгенске цеви (Слика 16.) које продукују две различите таласне дужине рендгенских зрака. Рендгенска цев са бакарном анодом продукује таласну дужину рендгенских зрака 1.540598(2) Å које је претходно филтрирано, док друга рендгенска цев са анодом од молибдена зрачи таласном дужином од 0,7093187 Å, такође претходно филтрираног зрачења.



Слика 17. Приказ уређаја:

Слика 18. Центрирање узорка

- 1. Рендгенска цев
- 2. Четвороосни Карра гониометар
- 3. Затварач за рендгенске зраке
- 4. Колиматор
- 5. Стопер за трансмитоване рендгенске зраке
- 6. Берилијумски прозор
- 7. Видео микроскоп

Узорак се центрира подешавањем вођица (Слика 18.) за горе-доле и лево-десно, док се кристал окреће сваки пут за 90°, а слика узорка се посматра са видео микроскопом или на монитору постављеном близу гониометра, а може се видети и на контролном рачунару.

Рендгенски зрак се генерише у посебном делу који се пуни високоволтажним рендгенским генератором. Оптика рендгенског зрака се састоји од затварача који има велику брзину, и монохроматора који служи за одабир прпоусног опсега спектра из цеви и колиматора за лимитирање снаге цеви. Рендгенски зраци улазе у детектор (ССD) који се састоји од низа кондензатора од силицијума, кроз берилијумски прозор, до вакуум јединице детектора (Слика 19). Сцинтилациони екран претвара фотоне рендгенског зрачења у светлост која се помоћу оптичких каблова спроводи према чипу детектора. Слој фосфора на екрану треба да буде што тањи, да обезбеди добру резолуцију, што је могуће дебљи, да апсобује надолазеће фотоне и што је могуће светлији да обезбеди што бољи квалитет. Светлосни зраци овде бивају конвертовани у нелектрисање које се даље манифестује као струјни-напонски сигнал који се потом дигитализује. Сам чип је смештен у вакуумску заштиту која га термално изолује и штити од кондензације, јер је потребно да се хлади како би се редуковала тзв. тамна струја. Да би се омогућио правилан рад детектора радна температура ССD чипа одржава се температурним сензорима на -40° С.

Конусно стакло које се налази испред CCD чипа апсорбује долазно зрачење и CCD штити од радијационог оштећења. (Фосфорни екран 90% апсобује до долазећих фотона Х-зрака.) Да би сачували детектор потребно је додатно зауставити стопером директно трансмитовано зрачење које прође кроз кристал, јер није од користи за сам експеримент. Како овај дифрактометарски систем има две рендгенске цеви тако има и два стопера који се подешавају сваки своју за ренгенску цев.



Слика 19. Шематски приказ проласка зрачења кроз систем камере до електронског дела уз помоћ којег се дигитализује

ССD сигнал је дигитализован 17-битном резолуцијом, двоструким узорковањем кола са аналогно —дигиталним конвертором и налази се у глави детектора. Пренос података преко оптичких влакана, подаци веза и други подаци налазе у рачунарској радној станици. Контролни програм очитава податке и чува их за анализу других података на рачунарском хард диску.

Силиконска база ССD чипа генерише тзв. тамне струје. Тамна струја настаје од спонтаног стварања парова електрон-шупљина и када силицијумска решетка услед повећања температуре завибрира јаче. Хлађење овог чипа смањује тамне струје.[6]

6.3. Дифракциони, кристалографски и подаци о утачњавању

Резултати дифракције за једињење 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)триен-16-нитрил (5) прикупљени су на собној температури уз употребу дифрактометра *Gemini S* (*Rigaku – Oxford Diffraction*) са MoK_α зрачења (λ = 0,7093187 Å). Редукција података за једињење 5 је изведена применом програмског пакета *CrysAlis RED* [10]. Структура једињења 5 је решена директним методама употребом SHELXT [11] програма, а утачњена SHELXL-2014/6 [11] програмом. Неводонични атоми су утачњавани анизотропно. Водоникови атоми повезани са атомима угљеника су генерисани и постављени на фиксиране позиције од 0,93 Å за CH, 0,97 Å за CH₂ и 0,96 Å за CH₃ а при утачњавању третирани изотропно. Водоников атом везан за кисеоник пронађен је из диферентне Фуријеове мапе и при утачњавању третирани изотропно. Сви прорачуни су извршени применом SHELXL97 [12], PARST [13] и PLATON [14] који су саставни део система програма WINGX [15]. Кристалографски подаци и параметри утачњавања су сумирани у табели 2. Одбране дужине веза, углови веза и торзиони углови дати су у табелама 6-10 у прилогу. Изглед молекуларне структуре за једињење **5** је приказан на сликама 20. и 21. У прилогу су дати детаљни структурни подаци за једињење **5**.

Хемијска формула	C ₁₈ H ₂₂ BrNO	
Mr	348.27	
Температура	293(2) K	
Кристалографски систем	Тригонални	
Просторна група	P31	
Параметри јединичне ћелије	<i>a</i> = 7.9048 (7) Å	α= 90°.
	<i>b</i> = 7.9048 (7) Å	β= 90°.
	<i>c</i> = 22.556 (2) Å	γ = 120°.
Запремина	1220.6 (2) Å ³	
Ζ	3	
Густина	1.421Mg/m ³	
Абсорпциони коефицијент	2.525 mm-1	
F(000)	540	
Димензије кристала	$0.57\times0.36\times0.24~\text{mm}^3$	
heta oncer	3.1 − 25.7 °.	
Милерови индекси	$h = -9 \rightarrow 9, k = -9 \rightarrow 5, l = -26 \rightarrow$	26
Број сакупљених рефлексија	3465	
Број независних рефлексија	2144 [R(int) = 0.0245]	

Табела 2. Кристалографски подаци и подаци о утачњавању за једињење 1.



C10

CF

01

Слика 20. ORTEP приказ молекулске структуре за једињење 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)триен-16-нитрил (**5**)

CS

C14

C8

C16



Слика 21. ОRTEP приказ молекулске структуре за једињење 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)триен-16-нитрил (**5**) дуж *а* осе.

6.4. Анализа водоничних веза

Информације о интра и интер молекулском водоничном везивању су веома корисне за разумевање различитих особина молекула (геометрије молекула, стабилности одређене доминантне конформације, а са тим и биолошке активности). Као што се може видети са слике 25. једињење садржи интермолекулске О-Н…N водоничне везе које повезују молекуле у "глава за реп" спиралну форму дуж *с* осе. Параметри ове водоничне везе су дате у табели 3.

Табела 3. Параметри водоничних веза за једињење 5.

D–HA	D-H	НА	DA	D–H…A	
једињење 5					
01-H1N1 ¹	0.83(10) Å	2.03(8) Å	2.846(15) Å	172(10)°	



Слика 22. Кристално паковање за једињење **5** са приказаном интермолекулском О-H…N водоничном везом која повезује молекуле у "глава за реп" спиралну форму дуж *с* осе. Водоникови атоми, осим инволвираних у водоничну везу, нису приказани због јасноће.

6.5. Испитивање релативног афинитета везивања тестираног једињења 5 за лиганд везујући домен естрогеног рецептора β (LDB-ERβ)

6.5.1. Принцип теста

Релативни афинитет везивања лиганада за естрогени рецептор одређен је флуоресцентним ћелијским тестом у ћелијама квасца *Saccharomyces cerevisiae*, развијеним у лабораторији др Блејка Питерсона [7]. Принцип теста се заснива на флуоресцентном резонантном трансферу енергије FRET између жутих флуоресцентних протеина (YFP) фузијом спојених са лиганд везујућим доменом естрогеног рецептора. Рекомбинантни хумани лиганд везујући домен са флуоресцентним протеином LBD-ERβ експримира се у ћелијама квасца под контролом GAL промотера. Након везивања одговарајућег лиганда, лиганд везујући домени естрогеног рецептора (LBD-ERβ) димеризују и хромофоре (YFP) прилазе на удаљеност при којој је резонантни трансфер енергије могућ (мању од 10 nm). Интензитет резултујуће флуоресценције у корелацији је са афинитетом везивања лиганда (Слика 23).



Слика 23. Принцип рада флуоресцентног ћелијског есеја у квасцу

6.5.2. Сојеви квасаца, плазмиди и услови раста

Сој Saccharomyces cerevisiae FY250 (МАТа, ura3-52, his32 Δ 00, leu2 Δ 1, trp1 Δ 6) и плазмидни конструкт pRF4-6-hER β LBD-EYFP (у даљем тексту LBD-YFP) за флуоресцентни ћелијски есеј обезбедио је Др. Блејк Петерсон (Dr. Blake Peterson, University of Kansas). Сојеви квасаца су трансформисани користећи методу литијум ацетат/полиетилен гликола (lithium acetate/polyethylene glycol method). Ћелије које су прихватиле наш плазмид, селектоване су засејавањем након трансформације на подлоге које не садрже триптофан (tryptophan dropout agar (SD-Trp)) и гајене су у инкубатору 3 дана на 30°С.

6.5.3. Флуоресцентни ћелијски есеј у квасцу

Почетне течне културе гајене су на 28°С у селектованом медијуму са 2% рафинозе. Густина ћелија одређена је мерењем апсорпције свестлости на 600 nm (OD₆₀₀). Конфлуентне ћелијске културе квасца су разблажене свежим селектованим медијумом са 2% рафинозе. Свежа култура је инкубирана под идентичним условима све док ћелије не достигну логаритамску фазу раста OD₆₀₀ од 0.4-0.6 (приближно 12 сати). Након што су ћелије достигле логаритамску фазу раста експресија LBD-YFP протеина је индукована додатком галактозе (2% коначна концентрација), а затим је додато тест једињење 5 коначне концентрације 10 μ M) и контроле.

Као позитивна контрола коришћен је природни лиганд рецептора естрон (E1) и познати антагонист Тамоксифен (TMX) који се користи у третману хормон зависног карцинома дојке, док је андростендион (ASD) послужио као негативна контрола.

Тамоксифен је антагонист естрогеног рецептора (спречава везивање естрогена за рецептор) у ткиву дојки путем његовог активног метаболита, хидрокситамоксифена, док у другим ткивима као што је ендометријум делује као агонист. Користи се ако стандардна терапија у лечењу хормон зависног карцинома дојке код жена у пременопаузи, као алтернатива инхибиторима ароматазе.

Позадинска флуоресценција ћелије измерена је додавањем DMSO без раствореног лиганда у коначној концентрацији од 1% (DMSO). Након додавања тестираног једињења и контрола, ћелије су инкубиране 14 сати у мраку на 25 °C.

За детекцију и квантификацију флуоресценције ћелија коришћене су две методе, мерење флуоресценције културе ћелија у микротитар плочама и мерење флуоресценције појединачних ћелија:

1. За мерење интензитета флуоресценције културе ћелија квасца коришћен је флуориметар (Fluoroskan Ascent FL, приказан на слици 24.) и таласне дужине ексцитације и емисије од 485 nm односно 538 nm. Вредности интензитета флуоресценције представљају средњу вредност три мерења. Интензитет флуоресценције је нормализован тако што је добијена вредност подељена са вредношћу густине ћелијске културе (мереном као абсорбанса светлости на 600 nm). Афинитет везивања лиганда изражен је као умножак вредности флуоресценције ћелијске културе која је третирана само са растварачем у одсуству лиганда (DMSO), табела 4. Хистограми су представљени у Microsoft Excel програму, са приказаним кумулативним грешкама мерења (дијаграм 1).



Слика 24. Флуориметар Fluoroskan Ascent FL, за мерење интезитета флуоресценције

	fold fluorescence ERbeta	Кумулативна грешка
DMSO	1.00	0.06
ASD	1.03	0.06
тмх	1.50	0.08
5	1.39	0.07
E1	1.56	0.08

Табела 4.	Детекција	флуориметром	(fold flurescence))
-----------	-----------	--------------	--------------------	---



Дијаграм 1.

2. За мерење флуоресценције појединачних ћелија коришћене су индуковане и лигандима третиране ћелије квасца у суспензији. Ћелије су посматране под увећањем 40х на микроскопу Olympus BX51 (слика 25) коришћењем FITC филтера (485 и 538 nm). Микрографије флуоресцентних ћелија квасца третираних различитим лигандима приказане су на слици 26. Квантификација је извршена дензитометријски коришћењем Image J програма. Анализирано је 50 ћелија по видном пољу, резултати су сумирани у табели 5 где је афинитет везивања лиганда изражен као умножак вредности флуоресценције ћелијске културе која је третирана само са растварачем у одсуству лиганда (DMSO). Хистограми су представљени у Microsoft Excel програму, са приказаним кумулативним грешкама мерења (дијаграм 2).



Слика 25. Olympus BX51, флуоресцентни микроскоп

	fold fluorescence ERbeta	Кумулативна грешка
DMSO	1.00	0.04
ASD	1.05	0.04
тмх	1.64	0.06
5	1.60	0.05
E1	1.60	0.05

Табела 5. Детекција флуоресцентним микроскопом (fold fluorescence)



Слика 26. Флуоресценти микрографи рекомбинантних ћелија третираних одговарајућим лигандима



DMSO

E1



ASD

тмх

7. ДИСКУСИЈА И ЗАКЉУЧАК

У овом раду су испитиване особине новосинтетисаног стероидног једињења:

• 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил (5)

Рендгенском стуктурном анализом недвосмислено је одређена молекулска структура једнињења **5** и добијени резултати су искоришћени за анализу молекулске структуре.

Користећи флуоресцентни ћелијски есеј измерен је и афинитет везивања једињења **5** за лиганд везујући домен естрогеног рецептора β (LDB-ERβ). Резултати флуоресцентног ћелијског есеја су дали нормализоване интензитете флуоресценције мерене флуориметром и флуоресцентним микроскопом, а за једињење **5** су износили 1,39 и 1,60 респективно. Ове вредности су упоређиване са резултатима флуоресцентног ћелијског есеја (под истим условима) за естрон (E1) и Тамоксифен (TMX).

Детаљна анализа молекуске структуре једињења 3-хидрокси-17-бромо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил као и биолошки тестови испитиваног једињења су нас је довели до следећих закључака:

- 1. све дужине веза и сви углови веза атома у молекулу испитиваног једињења 5 имају очекиване вредности
- 2. једињење **5** садржи интермолекулске О-Н…N водоничне везе, па је кристално паковање једињења **5** доминантно уређено О-Н…N водоничним везама
- из резултата флуоресцентног ћелијског есеја може се закључити да једињење 5 има релативно велики афинитет везивања за лиганд везујући домен естрогеног рецептора β (LDB-ERβ) у поређењу са природним лигандом тог рецептора естроном (E1) и познатим антагонистом Тамоксифеном (TMX) који се користи у третману хормон зависног карцинома дојке
- 4. једињење 5 је добар кандидат за даља биолошка испитивања.

Прилог

Табела 6. Координате атома (х 10⁴) и еквивалентни изотропни параметри померања (Å²х 10³) за једињење **5**.

	Х	У	Z	U(eq)
Br(1)	10377(1)	8463(1)	4348(1)	72(1)
O(1)	-1923(10)	-3491(8)	6447(3)	71(2)
C(5)	1184(10)	1233(10)	5731(3)	37(2)
C(10)	2824(10)	1091(9)	5587(2)	33(1)
C(1)	2776(10)	-640(9)	5751(2)	36(1)
C(14)	5646(9)	5589(9)	4558(2)	32(1)
C(13)	6696(9)	4796(9)	4162(3)	33(1)
C(12)	7376(10)	3685(11)	4568(3)	43(2)
C(16)	3361(12)	5874(12)	3844(3)	47(2)
N(1)	2021(11)	5045(12)	3549(3)	63(2)
C(18)	5410(10)	3453(10)	3665(3)	40(2)
C(8)	3929(9)	3941(9)	4901(2)	30(1)
C(17)	8466(9)	6419(11)	3839(3)	42(2)
C(7)	2909(11)	4689(10)	5312(3)	43(2)
C(2)	1200(11)	-2131(10)	6032(3)	43(2)
C(9)	4563(9)	2730(9)	5273(3)	33(1)
C(11)	5701(10)	2024(11)	4899(3)	42(2)
C(15)	5056(11)	6917(9)	4222(3)	39(2)
C(6)	1031(12)	3000(12)	5565(4)	58(2)
C(4)	-389(10)	-262(10)	6018(3)	41(2)
C(3)	-391(12)	-1958(10)	6166(3)	42(2)

Br(1)-C(17)	1.942(7)
O(1)-C(3)	1.366(9)
O(1)-H(1)	0.82(3)
C(5)-C(4)	1.375(10)
C(5)-C(10)	1.395(9)
C(5)-C(6)	1.508(10)
C(10)-C(1)	1.400(9)
C(10)-C(9)	1.513(9)
C(1)-C(2)	1.369(10)
C(1)-H(1A)	0.9300
C(14)-C(8)	1.540(8)
C(14)-C(15)	1.543(8)
C(14)-C(13)	1.548(9)
C(14)-H(14)	0.9800
C(13)-C(17)	1.530(9)
C(13)-C(18)	1.530(9)
C(13)-C(12)	1.540(9)
C(12)-C(11)	1.515(10)
C(12)-H(12A)	0.9700
C(12)-H(12B)	0.9700
C(16)-N(1)	1.140(10)
C(16)-C(15)	1.449(11)
C(18)-H(18A)	0.9600
C(18)-H(18B)	0.9600
C(18)-H(18C)	0.9600
C(8)-C(7)	1.527(9)
C(8)-C(9)	1.534(8)
C(8)-H(8)	0.9800
C(17)-H(17A)	0.9700
C(17)-H(17B)	0.9700
C(7)-C(6)	1.527(10)
C(7)-H(7A)	0.9700
C(7)-H(7B)	0.9700
C(2)-C(3)	1.365(11)

Табела 7. Дужине веза [Å] и углови [°]за једињење 5.

C(2)-H(2)	0.9300
C(9)-C(11)	1.528(9)
C(9)-H(9)	0.9800
C(11)-H(11A)	0.9700
C(11)-H(11B)	0.9700
C(15)-H(15A)	0.9700
C(15)-H(15B)	0.9700
C(6)-H(6A)	0.9700
C(6)-H(6B)	0.9700
C(4)-C(3)	1.381(10)
C(4)-H(4)	0.9300
C(3)-O(1)-H(1)	113(6)
C(4)-C(5)-C(10)	121.2(6)
C(4)-C(5)-C(6)	117.1(6)
C(10)-C(5)-C(6)	121.7(6)
C(5)-C(10)-C(1)	116.4(6)
C(5)-C(10)-C(9)	121.6(6)
C(1)-C(10)-C(9)	122.0(6)
C(2)-C(1)-C(10)	122.2(6)
C(2)-C(1)-H(1A)	118.9
C(10)-C(1)-H(1A)	118.9
C(8)-C(14)-C(15)	112.5(6)
C(8)-C(14)-C(13)	111.9(5)
C(15)-C(14)-C(13)	113.4(5)
C(8)-C(14)-H(14)	106.1
C(15)-C(14)-H(14)	106.1
C(13)-C(14)-H(14)	106.1
C(17)-C(13)-C(18)	104.1(5)
C(17)-C(13)-C(12)	109.2(5)
C(18)-C(13)-C(12)	109.9(6)
C(17)-C(13)-C(14)	112.7(5)
C(18)-C(13)-C(14)	113.5(5)
C(12)-C(13)-C(14)	107.4(5)
C(11)-C(12)-C(13)	112.6(6)
C(11)-C(12)-H(12A)	109.1

C(13)-C(12)-H(12A)	109.1
C(11)-C(12)-H(12B)	109.1
C(13)-C(12)-H(12B)	109.1
H(12A)-C(12)-H(12B)	107.8
N(1)-C(16)-C(15)	179.6(9)
C(13)-C(18)-H(18A)	109.5
C(13)-C(18)-H(18B)	109.5
H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
C(13)-C(18)-H(18C)	109.5
H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(7)-C(8)-C(9)	108.1(5)
C(7)-C(8)-C(14)	113.0(5)
C(9)-C(8)-C(14)	112.2(5)
C(7)-C(8)-H(8)	107.8
C(9)-C(8)-H(8)	107.8
C(14)-C(8)-H(8)	107.8
C(13)-C(17)-Br(1)	114.8(4)
C(13)-C(17)-H(17A)	108.6
Br(1)-C(17)-H(17A)	108.6
C(13)-C(17)-H(17B)	108.6
Br(1)-C(17)-H(17B)	108.6
H(17A)-C(17)-H(17B)	107.5
C(6)-C(7)-C(8)	111.1(6)
C(6)-C(7)-H(7A)	109.4
C(8)-C(7)-H(7A)	109.4
C(6)-C(7)-H(7B)	109.4
C(8)-C(7)-H(7B)	109.4
H(7A)-C(7)-H(7B)	108.0
C(3)-C(2)-C(1)	120.2(6)
C(3)-C(2)-H(2)	119.9
C(1)-C(2)-H(2)	119.9
C(10)-C(9)-C(11)	113.2(5)
C(10)-C(9)-C(8)	110.5(5)
C(11)-C(9)-C(8)	111.2(5)
C(10)-C(9)-H(9)	107.2

C(11)-C(9)-H(9)	107.2
C(8)-C(9)-H(9)	107.2
C(12)-C(11)-C(9)	112.0(6)
C(12)-C(11)-H(11A)	109.2
C(9)-C(11)-H(11A)	109.2
C(12)-C(11)-H(11B)	109.2
C(9)-C(11)-H(11B)	109.2
H(11A)-C(11)-H(11B)	107.9
C(16)-C(15)-C(14)	114.2(6)
C(16)-C(15)-H(15A)	108.7
C(14)-C(15)-H(15A)	108.7
C(16)-C(15)-H(15B)	108.7
C(14)-C(15)-H(15B)	108.7
H(15A)-C(15)-H(15B)	107.6
C(5)-C(6)-C(7)	114.2(6)
C(5)-C(6)-H(6A)	108.7
C(7)-C(6)-H(6A)	108.7
C(5)-C(6)-H(6B)	108.7
C(7)-C(6)-H(6B)	108.7
H(6A)-C(6)-H(6B)	107.6
C(5)-C(4)-C(3)	120.7(7)
C(5)-C(4)-H(4)	119.7
C(3)-C(4)-H(4)	119.7
C(2)-C(3)-O(1)	117.8(6)
C(2)-C(3)-C(4)	119.3(7)
O(1)-C(3)-C(4)	122.9(7)

	U^{11}	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
Br(1)	45(1)	63(1)	62(1)	-3(1)	-7(1)	-7(1)
O(1)	79(4)	45(3)	94(4)	29(3)	42(4)	35(3)
C(5)	46(4)	32(4)	34(3)	4(3)	6(3)	22(3)
C(10)	41(4)	33(3)	29(3)	-5(2)	-4(3)	22(3)
C(1)	46(4)	37(4)	33(3)	2(3)	4(3)	26(3)
C(14)	34(3)	30(3)	30(3)	-6(2)	-4(3)	13(3)
C(13)	26(3)	36(4)	37(3)	-2(3)	3(2)	15(3)
C(12)	41(4)	50(4)	46(4)	4(3)	1(3)	28(4)
C(16)	52(5)	47(4)	49(4)	4(3)	3(4)	31(4)
N(1)	60(5)	74(5)	70(4)	-5(4)	-10(4)	45(4)
C(18)	33(4)	43(4)	46(4)	-7(3)	0(3)	21(3)
C(8)	32(3)	25(3)	35(3)	-2(2)	-1(2)	16(3)
C(17)	30(4)	48(4)	40(3)	-1(3)	0(3)	13(3)
C(7)	57(5)	35(4)	47(4)	11(3)	17(3)	30(4)
C(2)	63(5)	32(4)	40(3)	5(3)	7(3)	29(4)
C(9)	34(4)	30(3)	33(3)	-2(2)	-2(3)	15(3)
C(11)	38(4)	39(4)	55(4)	5(3)	3(3)	24(3)
C(15)	49(4)	25(3)	43(3)	8(3)	7(3)	19(3)
C(6)	58(5)	49(5)	81(5)	24(4)	34(4)	37(4)
C(4)	38(4)	42(4)	47(4)	4(3)	9(3)	23(4)
C(3)	52(5)	28(4)	41(4)	12(3)	11(3)	17(4)

Табела 8. Анизотропни параметри померања (Ųx 10³) за једињење 5.

	Х	У	Z	U(eq)
H(1A)	3850	-782	5667	44
H(14)	6602	6417	4857	39
H(12A)	8033	3165	4330	52
H(12B)	8311	4590	4852	52
H(18A)	5235	4217	3366	61
H(18B)	4161	2512	3823	61
H(18C)	6027	2787	3493	61
H(8)	2967	3066	4611	36
H(17A)	8009	7010	3551	51
H(17B)	9109	5837	3623	51
H(7A)	3781	5426	5634	52
H(7B)	2603	5558	5093	52
H(2)	1214	-3265	6133	51
H(9)	5454	3595	5580	40
H(11A)	6211	1398	5155	50
H(11B)	4822	1060	4616	50
H(15A)	4793	7670	4509	46
H(15B)	6151	7830	3981	46
H(6A)	663	3457	5915	70
H(6B)	-4	2613	5275	70
H(4)	-1462	-130	6113	49
H(1)	-2750(90)	-3230(120)	6570(30)	60(30)

Табела 9. Координате атома водоника (х 10⁴) и еквивалентни изотропни параметри померања за једињење **5**.

Табела 10. Торзиони углови [°] за једињење 5.

C(4)-C(5)-C(10)-C(1)	-0.3(9)
C(6)-C(5)-C(10)-C(1)	-178.5(7)
C(4)-C(5)-C(10)-C(9)	-179.8(6)
C(6)-C(5)-C(10)-C(9)	2.0(10)
C(5)-C(10)-C(1)-C(2)	0.8(9)
C(9)-C(10)-C(1)-C(2)	-179.7(6)
C(8)-C(14)-C(13)-C(17)	-177.3(5)
C(15)-C(14)-C(13)-C(17)	54.0(8)
C(8)-C(14)-C(13)-C(18)	64.6(7)
C(15)-C(14)-C(13)-C(18)	-64.0(7)
C(8)-C(14)-C(13)-C(12)	-57.1(7)
C(15)-C(14)-C(13)-C(12)	174.3(6)
C(17)-C(13)-C(12)-C(11)	-179.1(6)
C(18)-C(13)-C(12)-C(11)	-65.5(7)
C(14)-C(13)-C(12)-C(11)	58.4(7)
C(15)-C(14)-C(8)-C(7)	-52.9(7)
C(13)-C(14)-C(8)-C(7)	178.0(5)
C(15)-C(14)-C(8)-C(9)	-175.4(5)
C(13)-C(14)-C(8)-C(9)	55.5(6)
C(18)-C(13)-C(17)-Br(1)	177.7(5)
C(12)-C(13)-C(17)-Br(1)	-64.9(7)
C(14)-C(13)-C(17)-Br(1)	54.3(7)
C(9)-C(8)-C(7)-C(6)	-64.3(8)
C(14)-C(8)-C(7)-C(6)	170.9(6)
C(10)-C(1)-C(2)-C(3)	-0.5(10)
C(5)-C(10)-C(9)-C(11)	-152.2(6)
C(1)-C(10)-C(9)-C(11)	28.3(8)
C(5)-C(10)-C(9)-C(8)	-26.7(8)
C(1)-C(10)-C(9)-C(8)	153.8(5)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	56.6(7)
C(14)-C(8)-C(9)-C(10)	-178.1(5)
C(7)-C(8)-C(9)-C(11)	-176.8(5)
C(14)-C(8)-C(9)-C(11)	-51.5(7)
C(13)-C(12)-C(11)-C(9)	-57.4(8)

C(10)-C(9)-C(11)-C(12)	177.3(5)
C(8)-C(9)-C(11)-C(12)	52.3(7)
C(8)-C(14)-C(15)-C(16)	-52.2(7)
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	76.0(8)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	173.5(7)
C(10)-C(5)-C(6)-C(7)	-8.2(11)
C(8)-C(7)-C(6)-C(5)	39.4(10)
C(10)-C(5)-C(4)-C(3)	-0.5(10)
C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	177.7(7)
C(1)-C(2)-C(3)-O(1)	180.0(7)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.3(11)
C(5)-C(4)-C(3)-C(2)	0.8(11)
C(5)-C(4)-C(3)-O(1)	-179.4(7)

Литература

- 1. Љиљана Карановић, Дејан Полети, Рендгенска структурна анализа. Београд, 2003.
- Драгослав Петровић, Светлана Лукић, Експериментална физика кондензоване материје. Нови Сад, 2000.
- Срђан Ракић, Душан Лазар, Жељка Цвејић, Агнеш Капор, Основе рендгеноструктурне анализе монокристала и поликристалних прахова. Нови Сад 2013.
- Оливера Клисурић: "Кристалографска истраживања 2 (2 хидроксифенил) 4 хидроксиметил - 4 - (метил - 2 - хидроксибензоат) оксазолина, C₁₈H₁₇O₆N", Дипломски рад, Нови Сад, 2000.
- Оливера Клисурић: "Водоничне везе, структура и биофизички аспекти механизма активности стероидних хормона - андрогена и антиандрогена", Докторска дисертација, Нови Сад, 2007.
- 6. Делови и структура дифрактометра за монокристал, Oxford diffraction *Gemini Xcalibur*, семинарски рад
- Smita S. Muddana and Blake R. Peterson, Fluorescent Cellular Sensors of Steroid Receptor Ligands, Department of Chemistry, The Pennsylvania State University, USA, 2003.
- 8. Jovanović-Šanta et al. J. Serb. Chem. Soc. 70 (4) 569–577 (2005)
- 9. Jovanović-Šanta et al. J. Serb. Chem. Soc. 64 (5. 6) 391-394 (1999)

- 10. Oxford Diffraction CrysAlis CCD and CrysAlis RED. Versions 1.171., Oxford Diffraction Ltd, Abingdon, Oxfordshire, England, 2008.
- 11. G. M. Sheldrick, Acta Cryst. A64, 112-122 (2008)
- 12. Sheldrick GM, SHELX97, *Programs for Crystal Structure Analysis*; University of Göttingrn, Germany, 1997.
- 13. Nardelli MJ., Appl. Cryst., 28, 659-662, 1995.
- 14. Spek AL., PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, University of Utrecht, The Netherlands, 1998
- 15. Farrugia LJ., J. Appl. Cryst. , 32, 876-881, 1999
- 16. Kawato et al. 2003
- 17. Miller, 1988
- 18. Rommerts, 1998
- 19. Hall, 1985
- 20. Luu-The et al. 1989
- 21. Roukonen et al. 1972; Laatikainen et al. 1971
- 22. Rubinow, Schmidt
- 23. Raynaud et al. 1979b
- 24. Duax et al. 1996
- 25. Internet

Биографија

Божана Пејаковић је рођена 01. Јануара 1984. године у Новом Саду. Након основог образовања, 1998. године уписује средњу медицинску школу "Драгиња Никшић" у Сремској Митровици. После краће паузе 2004. године уписује основне студије на Природно-математичком факултету у Новом Саду, смер медицинска физика.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА Редни број: РБР Идентификациони број: ИБР Тип документације: Монографска документација ΤД Тип записа: Текстуални штампани материјал T3 Врста рада: Дипломски рад ΒP Аутор: AУ Божана Пејаковић Ментор: MH Оливера Клисурић Наслов рада: Кристалографска и биолошка анализа 3-хидрокси-17-бромо-16,17-ΗP секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрила Језик публикације: српски (ћирилица) JΠ Језик извода: српски и енглески JN Земља публиковања: Србија ЗП Уже географско подручје: Аутономна покрајина Војводина УГП 2017 Година: ГО Издавач: Ауторски репринт И3 Место и адреса: Природно-математички факултет, Трг Доситеја Обрадовића 4, Нови MA Сад Физички опис рада: Поглавља 7; Страна 54; Литераура 25; Слика 26; Табела 5; Дијаграма ΦО 2 Научна област: ΗО Физика Научна дисциплина: HД Медицинска физика

Предметна одредница/ кључне	
речи:	Кристалографска и биолошка анализа З-хидрокси-17-бромо-16,17-
ПО	секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрила
удк	
Чува се:	Библиотека департмана за физику, ПМФ-а у Новом Саду
ЧУ	
Важна напомена:	Нема
ВН	
	Након испитивања структуре синтетисаног једињења установљена је
Извод:	његова детаљна грађа, елементарна ћелија, изглед решетке са
ИЗ	параметрима, углови и водоничне везе. На крају је испитивана његова
	биолошка активност.
Датум прихватања теме од НН већа: ДП	01. септембар, 2017.
Датум одбране:	25. октобар, 2017.
до	
Чланови комисије:	
КО	
Председник:	Проф. др Маја Стојановић
члан:	Проф. др Анђелка Ђелиђ
	·····
члан:	Проф. др Оливера Клисурић

UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number:	
Document type:	Monograph publication
Type of record:	Textual printed material
Content code:	Final paper
Author:	Božana Pejaković
Mentor/comentor:	Olivera Klisurić
Title: TI	Crystallographic and biological analysis 3-hidroksi-17-Br-16,17-sekoestar-1,3,5(10)-trien-16-nitril
Language of text:	Serbian (Cyrillic)
Language of abstract:	English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad
Physical description: PD	Chapters 7 ; Pages 54; Literature 25; Pictures 26; Table 5 ; Diagrams 2
Scientific field: SF	Physics
Scientific discipline: SD	Medical Physics
Subject/ Key words: SKW	Crystallographic and biological analysis 3-hidroksi-17-Br-16,17-sekoestar-1,3,5(10)-trien-16-nitril
UC	
Holding data: HD	Library of Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 4

None

Ν

Note:

Abstract:	After examining the structure of the synthesized compounds was
AD	angles and hydrogen bonds. At the end, their biological activity
Accepted by the Scientific Board:	01. september, 2017.
ASB	
Defended on:	25. october, 2017.
DE	
Thesis defend board:	
DB	
President:	Prof. dr Maja Stojanović
Member:	Prof. dr Anđelka Ćelić
Member:	Prof. dr Olivera Klisurić