

**Наставно-научном већу**

**Универзитета у Београду - Хемијског факултета**

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаној 13. јуна 2019. године одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Милице Селаковић, мастер хемичара, истраживача-сарадника Иновационог центра Хемијског факултета у Београду, под називом:

**„Развој нових инхибитора пролиферације паразита *Plasmodium falciparum* и малигних ћелија“**

Пошто смо поднели дисертацију прегледали, подносимо Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи:

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација **Милице Селаковић** (рођене Виденовић) написана је на 196 страна А4 формата и садржи 60 слика (укључујући 14 слика у Прилогу), 10 табела и 13 схема. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (2 стране), Општи део (31 страна), Наше радове (60 страна), Експериментални део (68 страна), Закључак на српском језику (2 стране), Закључак на енглеском језику (2 стране), Прилог (14 страна) и Литературу (17 страна). Поред тога, дисертација садржи Сажетак на српском и енглеском језику (по две стране), Листу скраћеница (4 стране), Садржај (2 стране), биографију и библиографију кандидата.

У **Уводу** је дефинисан предмет истраживања и укратко је описан значај изналажења ефикасних инхибитора пролиферације паразита маларије и малигних ћелија. Такође, дат је кратак преглед садржаја саставних поглавља дисертације.

У **Општем делу** је укратко приказан развој истраживања која повезују маларију и канцер. Наведени су литературни подаци о маларији, паразиту *Plasmodium falciparum*, преглед постојећих антималярика и актуелних стратегија у развоју нових терапеутика. Дати су општи подаци о канцеру, узроцима настанка, основним методама лечења и изложен је преглед значајних деривата бензотиазола са антитуморском активношћу.

Поглавље **Наши радови** садржи резултате који су остварени у току израде дисертације. Приказана је синтеза нових деривата 4-аминохинолина и резултати испитивања њихове антималяријске активности. Описана је и синтеза нових деривата 2-аминобензотиазола и анализирани су резултати испитивања њихове инхибиторне активности према MCF-7 и NT2/D1 ћелијским линијама хуманог канцера. Додатно, приказано је испитивање антитуморске активности одабраног 4-аминохинолинског деривата према ћелијским линијама аденокарцинома дојке у *in vitro* и *in vivo* условима. На крају овог поглавља добијени резултати су дискутовани.

У **Експерименталном делу** дат је детаљан опис синтезе нових једињења и подаци о њиховој структурној карактеризацији добијени инструменталним методама. Приказана је чистоћа тестираних једињења која је одређена HPLC методом. Додатно, описани су експериментални поступци извођења биолошких тестова.

У **Закључку** су наведени најзначајнији налази проистекли из приказаних резултата.

У **Прилогу** се налазе параметри добијени током испитивања *in vitro* антипролиферативне активности једињења на пет концентрација (SRB есеј, Национални институт за рак, САД).

**Литература** (234 цитата) обухвата списак коришћених радова, књига и других релевантних извора из области које дисертација покрива.

## **Б. Кратак преглед остварених резултата**

Маларија је једна од најраспрострањенијих паразитских болести на свету, док су малигна обољења други по реду узрочник смрти у развијеним земљама. Проналажење ефикасног терапеутика један је од императива истраживања на овим пољима. Третман обе болести захтева супресију интензивне пролиферације паразита рода *Plasmodium*, када је у питању маларија, односно малигну ћелију случају канцера.

Истраживање представљено у овој докторској дисертацији обухвата вишестепену синтезу 12 нових деривата 4-аминохинолина и испитивање њихове антималяријске активности у различитим фазама животног циклуса паразита маларије у *in vitro* и *in vivo* условима, као и синтезу 25 нових деривата бензотиазола и испитивање њихове антипролиферативне активности према малигним ћелијама у *in vitro* условима. Испитана је и антитуморска активност најактивнијег инхибитора развоја паразита маларије, аминихинолинског деривата **38 (MVNP001)**, у *in vitro* и *in vivo* условима. Такође, испитано је и дејство одабраних деривата аминихинолина према паразиту лајшманије *in vitro*.

Синтеза нових деривата 4-аминохинолина изведена је са циљем унапређења биолошке активности раније синтетисаних тиофенских деривата аминихинолина у оквиру истраживачке групе професора Богдана Шолаје. Резултати испитивања *in*

*in vitro* антиплазмодијалне активности нових једињења према различитим сојевима *P. falciparum* у еритроцитној фази животног циклуса паразита указали су да продужавање алкил-низа, који повезује ароматични носач и аминоквинолинску фармакофору, значајно доприноси активности једињења. Показан је повољан утицај цијано-групе на ароматичном носачу аминоквинолинске фармакофоре и метиловања бензилног амина на антималяријску активност. Идентификовани су деривати који су активнији од хлорокина према хлорокин-резистентним сојевима *P. falciparum* у еритроцитној фази и чија је инхибиторна активност већа према хлорокин-резистентним сојевима у поређењу са хлорокин-осетљивим сојевима паразита. Показана је значајна *in vitro* активност цијано-деривата према спорозоитима *P. berghei* и умерена активност према зрелим гаметоцитима *P. falciparum*. Делумична редукција квинолинског прстена није допринела побољшању активности, као ни везивање имидазопиперазинског прстена за аминоквинолинску фармакофору.

Најактивнији деривати нису токсични према здравим мишевима на примењеним концентрацијама, а два одабрана аминоквинолина исказала су умерену антималяријску активност у *in vivo* условима, два пута продужавајући живот мишева инфицираних паразитом *P. berghei* у поређењу са контролом.

Додатно, тиофенски деривати 4-аминоквинолина и 5,6,7,8-тетрахидроквинолина умерено су активни према промастиготима паразита лајшманије *L. infantum* и *L. tropica in vitro*.

У наставку испитивања антипролиферативног потенцијала синтетисаних деривата, најпотентније једињење према паразиту маларије, аминоквинолински дериват **38 (MVNP001)**, исказао је *in vitro* инхибиторну активност према пролиферацији две линије хуманог аденокарцинома дојке MCF-7 и MDA-MB-231. Испитан је и антиангиогенезни потенцијал једињења према ендотелним ћелијама Ea.hy926, који је, затим, потврђен и на трансгеним ембрионима зебра-рибица *Tg(fill:EGFP)*. У ксенографт моделу канцера на ембрионима зебра-рибица, који је успостављен ксенотрансплантацијом ћелијских линија MCF-7 и MDA-MB-231 у ембрионе, једињење је инхибирало развој тумора при нетоксичним концентрацијама *in vivo*. Резултати испитивања антималяријске и нарочито антитуморске активности деривата **38 (MVNP001)** недвосмислено указују на значај даљег истраживања фармаколошких особина овог једињења.

Синтетисани карбамати и амиди 2-аминобензотиазола показали су *in vitro* антипролиферативну активност према широком спектру ћелијских линија хуманог канцера. Увид у детаљнији механизам њиховог дејства на ћелијском нивоу пружили су резултати експеримената са одабраним дериватима на MCF-7, ћелијској линији аденокарцинома дојке и NT2/D1, ћелијској линији хуманог тератокарцинома са патофизиолошким особинама тестикуларног тумора. На MCF-7 ћелијама показано је да испитивана једињења доводе до застоја ћелијског циклуса

у G2/M фази, што индукује апоптозу која се одвија преко митохондрија. Паралелно са индукцијом апоптозе, деривати бензотиазола смањују ниво производње унутарћелијских реактивних кисеоничних врста. Експерименти на NT2/D1 ћелијској линији показали су да карбамати бензотиазола доводе до губитка способности адхезије ћелија, консеквентно индукујући масовну апоптозу. Такође, показана је инхибиторна способност одабраних најактивнијих деривата према формирању и расту колонија, миграцији и инвазивности NT2/D1 ћелија *in vitro*. Имајући у виду изузетну селективност једињења према малигним ћелијама *in vitro* у односу на здраве ћелије и нетоксичност деривата у *in vivo* условима, нови деривати 2-аминобензотиазола представљају потенцијалне кандидате за детаљнију даљу анализу њиховог антитуморског дејства.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе**

Маларија и канцер представљају здравствени проблем светских размера. Маларија спада у најраспрострањеније паразитске болести на свету. Изазива је пет врста паразита из рода *Plasmodium* који на људе преносе убодом инфициране женке комараца рода *Anopheles*. До најопаснијих здравствених компликација доводе *P. falciparum* и *P. vivax*, док *P. falciparum* исказује највећу стопу морталитета. Због широко распрострањене резистенције паразита маларије на постојеће лекове и климатских промена које доприносе развоју погодних животних услова за комарце, преноснике инфекције, маларија представља глобалну претњу. С друге стране, канцер представља једну од најсмртоноснијих болести модерног доба, која је последица неконтролисаног раста и размножавања ћелија и изостанка механизма контроле ћелијске пролиферације. Циљ ове дисертације је развој структура једињења која исказују инхибиторну активност према интензивној пролиферацији паразита, узрочника маларије, и једињења која инхибирају пролиферацију малигних ћелија. Постављени циљ подстакнут је онедавним развојем истраживања која указују на могућу везу ова два обољења.

Деривати 4-аминохинолина предмет су опсежних истраживања на пољу развоја нових антималарика, упркос широкој распрострањености резистентних сојева *Plasmodium* паразита према хлорокину, антималарику који је скоро четири деценије у клиничкој употреби, и његовим аналозима. У појединим афричким крајевима, у којима се хлорокин више не користи, примећена је спора, али прогресивна појава сојева осетљивих на хлорокин. Једноставна терапеутска примена, ниска цена производње и релативна нетоксичност 4-аминохинолина додатно оправдавају актуелност истраживања у овој области. Наша досадашња истраживања у области синтезе потенцијалних антималарика показала су да једињења код којих је алкил-низом повезана аминокхинолинска фармакофора за ароматични носач исказују

значајну *in vitro* антималяријску активност према хлорокин-осетљивим и хлорокин-резистентним сојевима *P. falciparum*, уз остваривање инхибиције  $\beta$ -хематина. Показало се да увођење додатног  $\pi$ -система у структуру деривата 4-аминохинолина са тиофенским носачем повољно утиче на инхибицију резистентних сојева паразита маларије. Деривати са алкил-низом састављеним од осам метиленских група, синтетисани у оквиру ове дисертације, показали су значајно побољшану *in vitro* активност у еритроцитној фази животног циклуса паразита, посебно према резистентним сојевима *P. falciparum* и остварили ефикаснију инхибицију настајања  $\beta$ -хематина у ВН1А тесту. У литератури је познато свега неколико деривата 4-аминохинолина активних у више од једне фазе животног циклуса паразита, *N*-цинамоил-деривати и 4-аминохинолини коњуговани са примакином активни су у фази јетре и еритроцитној фази *in vitro*, а 4-аминохинолин са адамантанским носачем и у *in vivo* условима. Једињења TDR58845 и TDR58846 инхибирају развој зрелих гаметоцита у *in vitro* условима. У овој дисертацији идентификовани су деривати аминахинолина који врло ефикасно инхибирају развој спорозоита (фаза јетре) *P. berghei* ANKA соја, притом не узрокујући токсичне ефекте на хепатоцитима. Поред тога једињења умерено инхибирају и развој зрелих гаметоцита, што није уобичајено за крвне шизонтициде, који обично делују на гаметоците у раним фазама развоја.

Последњих година испитује се примена хинолинских антималярика у терапији других обољења, првенствено канцера, захваљујући способности инхибиције еритроцитних форми паразита који се интензивно размножавају и аналогичи са брзорастућим ћелијама тумора, акумулацији у лизозомима и инхибицији аутофагије, као и сензитизацији малигнућих ћелија на антитуморску терапију. Имајући то у виду, испитано је и показано антитуморско дејство 4-аминохинолина **38 (MVNP001)** у *in vitro* и *in vivo* условима.

Терапија канцера је изузетно комплексна услед хетерогеног карактера малигнућег ткива, непредвидивог одговора на терапеутске приступе и високог степена токсичности постојећих лекова. Неопходно је развити лек који би се са већом селективношћу и ефикасношћу примењивао у терапији канцера. У литератури је познато да деривати бензотиазола исказују широк спектар биолошких активности (*Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 89, 207–251). Показано је да супституисаност 2-аминобензотиазола различитим групама у положају С(6) има утицај на антитуморско дејство бензотиазола. У оквиру ове дисертације испитана је антитуморска активност синтетисаних нових деривата карбамата и амида бензотиазола са тиоалкил-групама у положају С(6) бензотиазоловог језгра. Увид у детаљнији механизам дејства одабраних деривата пружили су резултати експеримената изведених на MCF-7 ћелијској линији хуманог аденокарцинома дојке, који укључују испитивање утицаја једињења на ћелијски циклус, апоптозу, регулаторне протеине апоптозе и продукцију реактивних кисеоничних врста. По

први пут је испитано дејство деривата бензотиазола на миграторне и инвазивне особине NT2/D1 ћелијске линије хуманог тератокарцинома.

## Г. Научни радови и саопштења који чине део дисертације

### Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

1. Videnović, M.; Mojsin, M.; Stevanović, M.; Opsenica, I.; Srdić-Rajić, T.; Šolaja, B. Benzothiazole carbamates and amides as antiproliferative species, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1096.  
Chemistry, Medicinal (4/59) **IF<sub>2017</sub> = 4,816**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418307396>

### Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21):

1. Konstantinović, J.; Videnović, M.; Orsini, S.; Bogojević, K.; D'Alessandro, S.; Scaccabarozzi, D.; Terzić Jovanović, N.; Gradoni, L.; Basilico, N.; Šolaja, B. A. Novel Aminoquinoline Derivatives Significantly Reduce Parasite Load in Leishmania infantum Infected Mice, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2018**, *9*, 629.  
Chemistry, Medicinal (12/59) **IF<sub>2017</sub> = 3,794**

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.8b00053>

### Радови саопштени на скуповима од међународног значаја штампани у изводу (M34):

1. Milica Videnović, Tatjana Srdić-Rajić, Igor Opsenica, Siniša Radulović, Bogdan Šolaja, “New benzothiazolamine derivatives as inducers of an early apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell line”, XXXVI edition of European School of Medicinal Chemistry, National Seminar for PhD Students, ESMEC, Urbino, Italy, June 26 – July 1, page 75

### Радови саопштени на скуповима од националног значаја штампани у изводу (M64):

1. Milica Videnović, Marija Mojsin, Tatjana Srdić-Rajić, Igor Opsenica, Milena Stevanović, Bogdan Šolaja, “Potencijalno antimetastatsko i antiproliferativno dejstvo derivata benzotiazola na ćelije embrionalnog humanog teratokarcinoma NT2/D1”, 55. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 8 – 9. Jun 2018, Zbornik radova (MH P 09), str. 87; ISBN 978-86-7132-069-6
2. Jelena M. Konstantinović, Nataša Terzić, Milica Videnović, Katarina Bogojević, Nicoletta Basilico, Luigi Gradoni, Bogdan A. Šolaja, “Derivati aminohinolina pokazuju aktivnost protiv lajšmanija parazita u in vivo uslovima”, 5. Konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 29 – 30. Septembar 2017, Zbornik radova (OP (Y)1), str. 95; ISBN 978-86-7132-066-5

3. Milica Videnović, Tatjana Srđić-Rajić, Igor Opsenica, Siniša Radulović, Bogdan Šolaja, “Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti novih derivata benzotiazolamina prema MCF-7 ćelijskoj liniji humanog kancera dojke”, 53. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, 10–11. Jun 2016, Zbornik radova (OHO5), str. 99; ISBN 978-86-7132-061-0
4. Milica Đ. Videnović, Bogdan A. Šolaja, “Nova generacija 4-aminohinolina: dizajn, sinteza i antimalarijska aktivnost”, 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29 – 30. Maj 2015, Zbornik radova (OH-20), str. 134; ISBN 978-86-7132-056-6

#### **Д. Провера оригиналности докторске дисертације**

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена 6. септембра 2019. године на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да подударање текста износи 18%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Стога сматрамо да је докторска дисертација Милице Селаковић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

#### **Ђ. Закључак**

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације кандидата Милице Селаковић под насловом: „Развој нових инхибитора пролиферације паразита *Plasmodium falciparum* и малигних ћелија“, закључила да резултати објављени у оквиру ове докторске дисертације представљају оригиналан и научно вредан допринос у органској и медицинској хемији. У приложеној докторској дисертацији кандидаткиња је успешно одговорила на постављене циљеве који се односе на синтезу и карактеризацију нових деривата аминоксинолина и бензотиазола, као и на испитивање њихове биолошке активности и токсичности. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су у оквиру два научна рада (један рад у часопису категорије M21a и један рад у часопису категорије M21). Такође, резултати истраживања презентовани су у оквиру пет саопштења штампаних у изводима на научним скуповима (један међународног значаја и четири националног значаја).

Израда ове докторске дисертације омогућена је пројектом Министарства просвете, науке и технолошког развоја (172008) и пројектом Ф60 Српске академије наука и уметности, а изведена је у сарадњи са Институтом за онкологију и радиологију Србије, Институтом за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,

Институтом за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Универзитетом у Милану, Италија, Институтом за молекуларну медицину у Лисабону, Португалија и Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland, USA.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Научно-наставном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Милице Селаковић под насловом „Развој нових инхибитора пролиферације паразита *Plasmodium falciparum* и малигних ћелија“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора хемијских наука.

У Београду 6. септембра 2019. године

Академик Богдан А. Шолаја  
професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета у пензији  
(ментор)

Др Драгана Милић  
редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета

Др Игор Опсеница  
ванредни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета

Др Влатка Вајс  
научни саветник Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у  
Београду

Др Татјана Срдић-Рајић  
научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије