

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE**

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj 12.09.2019. godine, donelo je **Odluku (1499/2)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „**Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje proapoptotske aktivnosti novih liganada imidazolinskih receptora**“, kandidata Jelice Vučićević, magistra farmacije, studenta doktorskih akademskih studija, modul Farmaceutska hemija na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu.

Komisija u sastavu:

- 1. Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor, mentor,**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 2. Dr Nevena Veljković, naučni savetnik, mentor,**  
Institut za nuklearne nauke Vinča
- 3. Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor,**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 4. Dr. sc. Tatjana Srđić-Rajić, naučni savetnik,**  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

# IZVEŠTAJ

## 1 PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija Jelice Vučićević, magistra farmacije, pod nazivom „**Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje proapoptotske aktivnosti novih liganada imidazolinskih receptora**“ napisana je na 153 strane standardnog formata (prored 1,5; font *Times New Roman* - 12). Doktorska disertacija sadrži **Rezime** na srpskom i **Abstract** na engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. Uvod, 2. Cilj rada, 3. Eksperimentalni deo, 4. Rezultati i diskusija, 5. Zaključak, 6. Literatura.**

Disertacija sadrži 36 slika, 11 tabela i 250 literaturnih navoda.

## 2 OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je permeabilnost 18 liganda  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i 22 leka koja deluju na Centralni Nervni Sistem (CNS) kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) primenom paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) i bioparticione micelarne hromatografije (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC) (Di et al., 2003).

Na osnovu dobijenih PAMPA rezultata ispitivani imidazolini su klasifikovani u 3 grupe:

- jedinjenja sa visokom permeabilnošću kroz KMB (efaroksan, gvanabenz, gvanfacin, harman, harmin, idazoksan, ksilometazolin, nafazolin i rilmenidin)
- jedinjenja sa niskom permeabilnošću kroz KMB (brimonidin, moksonidin, agmatin i amilorid)
- jedinjenja koja se ne mogu klasifikovati ni u jednu od ove dve grupe (klonidin, oksimetazolin, tetrahidrozolin, tizanidin i tramazolin)

Vrednosti dobijene PAMPA ( $\log P_e$ ) i BMC ( $\log k_{\text{BMC}}$ ) metodama su dalje analizirane kvantitativnim odnosom strukture i permeabilnosti jedinjenja (eng. *Quantitative Structure-Permeability Relationship*, QSPR). Dvodimenzionalne strukture ispitivanih jedinjenja su generisane primenom ChemBioDraw Ultra 13.0 softvera. Njihovi dominantni molekularni/katjonski oblici na pH = 7,4 su određeni korišćenjem MarvinSketch 6.1.0 softvera (ChemAxon, 2013), dok je konformacija odabranih molekularnih/katjonskih oblika ispitivanih jedinjenja optimizovana primenom B3LYP /6-31G (d,p) nivoa *Density Functional Theory* (DTF) ((Becke, 1993); (Lee et al., 1988)) u ChemBio3D Ultra 13.0 programu (CambridgeSoft Corporation, 2013). Geometrijski, konstitucijski, fizičko-hemijski, termodinamički i elektronski deskriptori optimizovanih struktura ispitivanih jedinjenja su izračunati u ChemBio3D Ultra 13.0, Dragon 6.0 (Talete srl, 2010) i ADMET Predictor 6.5 (Simulation Plus, Inc., 2013) programima.

Da bi se formirali pouzdani QSPR modela, isključeni su deskriptori sa konstantnim vrednostima. Takođe, izračunata je interkorelacija između deskriptora. Parovi molekularnih deskriptora sa interkorelacijom većom od 0,99 (kod metode najmanjih kvadrata, eng. *Partial Least Squares* - PLS) i 0,90 (kod multiple linearne regresije, eng. *Multiple Linear Regression* - MLR i veštačkih neuronskih mreža, eng. *Artificial Neural Networks* - ANNs analizu) su ispitani i oni koji imaju veću uticaj na zavisnu varijablu ( $\log P_e$ ) su korišćeni za građenje QSPR modela, dok su ostali eliminisani iz grupe.

PAMPA efektivne permeabilnosti ispitivanih jedinjenja ( $\log P_e$ ) i njihove  $\log k_{\text{BMC}}$  vrednosti su korišćene kao zavisne varijable ( $Y$ ), dok su izračunati molekularni parametri predstavljali nezavisne varijable ( $X$ ) u QSPR studiji. Metoda najmanjih kvadrata (PLS) je izvedena korišćenjem SIMCA P+ 12.0 programa, dok su modeli dobijeni multiplom linearnom regresijom (MLR) i veštačkim neuronskim mrežama (ANNs) formirani u STATISTICA Neural Network 4.0.

Analizom glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) koja je sprovedena uzimajući u obzir sve izračunate deskriptore set ispitivanih jedinjenja je podeljen na trening set koji je korišćen za formiranje modela i test set za eksternu validaciju modela.

Pokazano je da promene koje bi trebalo da poboljšaju permeabilnost su: (1) uvođenje elektronegativnih atoma u aromatičnu strukturu, (2) supstitucija atoma broma ili hidroksilnih grupa njihovim izosterima (npr. fluorom ili hlorom), (3) uvođenje voluminoznijih grupa kao i atoma koji imaju visoku Sanderson elektronegativnost. Sa druge strane, prisustvo gvanidinske ili aminogvanidinske grupe, kao i metil i izobutil grupa pokazano je da ima negativan uticaj na KMB permeabilnost.

Pored PAMPA i BMC metoda, retenciono ponašanje liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS je ispitano primenom konvencionalne reverzno fazne hromatografije visokih performansi (eng. *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography*-RP-HPLC). Iako su retencioni faktori dobijeni u ovom sistemu pokazali nisku korelaciju sa eksperimentalnim  $\log BB$  vrednostima, uočena je visoka korelacija sa eksperimentalno dobijenim  $\log P$  vrednostima i  $\log P$  vrednostima dobijenim koristeći ACD/i-Lab softver. Stoga se smatra da se ovaj retencioni faktor može koristiti kao pouzdan parametar lipofilnosti liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS.

Novije studije su potvrdile da imidazolinski derivati pored kardiovaskularne regulacije, ispoljavaju i druge biološke efekte kao što su kontrola apoptoze i proliferacije ćelija. Pokazano je da samo rilmenidin, koji je snažan I<sub>1</sub>-IR agonista, ispoljava proapoptotsku aktivnost na K562 ćelijskoj liniji blastične faze hronične mijeloidne leukemije vezujući se za I<sub>1</sub>-IR kandidat, nisharin, dok su moksonidin (umereno efikasni I<sub>1</sub>-IR agonista) i efaroksan (antagonista I<sub>1</sub>-IR) neaktivni.

U ovoj disertaciji dodatno je ispitan i odnos između strukture i proapoptotske aktivnosti rimnidina i njegovih derivata. Identifikovana su nova jedinjenja sa drugačijom hemijskom strukturom, a koja pokazuju aktivnost i mehanizam dejstva kao i rilmenidin. U cilju identifikacije novih jedinjenja primenjena je metoda virtuelnog skrininga (eng. *Virtual Screening*, VS) koja uključuje filtriranje baze na osnovu vrednosti AQVN deskriptora (eng. *Average Quasivalence Number*) koji se računa za dalekodosežne međumolekulske interakcije organskih molekula i primenu kombinovanih metoda virtuelnog skrininga koje uzimaju u obzir sličnost između GRID molekulskih interakcionih polja ispitivanih jedinjenja i rilmenidina, odnosno aktivnog mesta nisharina) ((**Veljkovic et al., 2007**) (**Cross et al., 2010**); (**Baroni et al., 2007**)).

U skriningu zasnovanom na ligandu (eng. *Ligand Based Virtual Screening*, LBVS), jedinjenja iz baze su rangirana na osnovu njihove sličnosti u strukturi sa rilmenidinom (ChEMBL289480), dok su u skriningu zasnovanom na strukturi proteina (eng. *Structure Based Virtual Screening*, SBVS) rangirana na osnovu njihovog poklapanja sa aktivnim mestom nisharina uzimajući u obzir GRID molekulska interakciona polja. Pošto kristalografska struktura nisharina nije poznata, u ovoj disertaciji je korišćen homologi model ovog proteina (**Nikolic et al., 2013**). Vezujući džep proteina je identifikovan korišćenjem *FLAPsite* algoritma za detekciju džepova (**Sirci et al., 2012**).

Baza jedinjenja korišćena za *in silico* skrining je sadržala više od  $9 \times 10^6$  molekula. Bazu su činila virtuelna jedinjenja generisana primenom Smi-Lab softvera (Schüller et al., 2003), kao i jedinjenja koja su bila ispitivana u okviru drugih istraživanja (Radi et al., 2013). Kao ulazne varijable za Smi-Lab softver korišćene su različite komercijalno dostupne polazne supstance, čijim kombinovanjem su generisani novi molekuli.

Ovom kombinacijom različitih tehnika selektovano je jedanaest jedinjenja koja su se strukturno razlikovala od već poznatih I<sub>1</sub>-IR agonista. Izabrani ligandi su sintetisani pod mikrotalasnim uslovima korišćenjem mikrotalasnog reaktora *CEM Microwave Synthesizer-Discover* i biološki ispitani. *In vitro* testiranjima pokazano je da je jedinjenje **5** najaktivnije i da je njegova citotoksična aktivnost na K562 ćelijskoj liniji slična aktivnosti rilmenidina. Citometrijskom analizom je utvrđeno da ovo jedinjenje dovodi do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi i smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa. Pored apoptotske aktivnosti ispitana je i antiproliferativna aktivnost jedinjenja **5** gde je uočena značajna inhibicija formiranja kolonija K562 ćelija na dozno zavistan način.

Takođe, ni jedno od jedanaest selektovanih i sintetisanih jedinjenja nije pokazalo značajan afinitet na rekombinantnim humanim  $\alpha_{2A}$  adrenergičkim receptorima, što ukazuje na njihovu selektivnost ka imidazolinskim I1-R.

K562 ćelijska linija je relativno neosetljiva na apoptozu indukovanu lekovima koji oštećuju DNK, kao što je doksorubicin. U ovoj disertaciji je pokazano da kombinovana primena jedinjenja **5** i doksorubicina dovodi do snažnije apoptoze u poređenju sa samom primenom doksorubicina (64% u odnosu na 20%) što ukazuje na potencijal korišćenja jedinjenja **5** i njegovih derivata kao adjuvantnih agenasa u konvencionalnim terapijama za lečenje tumora koji imaju smanjenu osetljivost na lekove slične doksorubicinu i izražene neželjene efekte.

Integrisani medicinsko hemijski pristup predstavljen u ovoj disertaciji je doveo do identifikovanja novog jedinjenja (jedinjenja **5**) koje se može iskoristiti za dalje ispitivanje I<sub>1</sub>-IR signalnog puta, kao i za razvoj adjuvantnih agenasa koji se mogu koristiti u terapiji hronične mijeloidne leukemije koja ima smanjenu osetljivost na lekove slične doksorubicinu.

Imajući u vidu da se imidazolinski ligandi pored imidazolinskih receptora, koji su ciljno mesto njihovog dejstva, vezuju i za G-protein kuplovane receptore (eng. G-protein coupled receptors, GPCR), u ovoj disertaciji je primenjena metoda virtuelnog skrininga u cilju identifikacije novih 'off targets' ove grupe jedinjenja. Ispitivani set jedinjenja se sastojao od 59 liganda  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora sa p*Ki* (I<sub>1</sub>-IR i/ili I<sub>2</sub>-IR) vrednošću

većom od 5 i jedinjenja **5**, prethodno selektovanog VS protokolom, koje je pokazalo značajnu antiproliferativnu/proapoptotsku aktivnost delujući na nisharin. Strukture ispitivanih jedinjenja su minimizovane u LigPrep, Maestro (Schrödinger Release 201-1) koristeći OPLS3 (eng. *Optimized Potentials for Liquid Simulations*) polje sile i njihova moguća naelektrisanja i tautomerni oblici na pH  $7 \pm 2$  su generisani koristeći Epik algoritam. Sa druge strane, set od 399 humanih GPCR koji obuhvata kristalne strukture i homologe modele je preuzet sa GPCR baze podataka (gpcrib.org). 3D strukture ovih proteina su optimizovane (PROKA pH = 7) i minimizovane koristeći OPLS3 polje sile u *Maestro* programu. Takođe, molekuli vode su uklonjeni iz proteina i dodati su polarni vodonici ((**Jorgensen and Tirado-Rives, 1988**); (**Jorgensen et al., 1996**)).

Vezivanje liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora za GPCRs je ispitano primenom *Glide* softvera (eng. *Grid-based Ligand Interaction Docking with Energetics*), Schrödinger 2015-3 ((**Halgren et al., 2004**); (**Friesner et al., 2004**)). *Glide* je korišćen za pripremu koordinata vezujućeg mesta proteina i automatizaciju *in silico* dokinga.

Beta adrenergički, dopaminski i muskarinski receptori su selektovani kao potencijalni 'off targeti' za određene ligande imidazolinskih i/ili  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora kao što su BDF6143, BU224, BU226, ksilometazolin i jedinjenje **5**. Dobijeni rezultati mogu biti korisni u razumevanju potencijalnih neželjenih efekata ovih jedinjenja ili u pronalaženju njihovih novih terapijskih primena.

### 3 UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Imidazolini predstavljaju veliku grupu biološki aktivnih jedinjenja koja imaju široku terapijsku primenu. Ova heterogena grupa liganada svoju aktivnost ostvaruje delovanjem na imidazolinske receptore (I-IR) ((Eglen et al., 1998); (Head and Mayorov, 2006)) i na  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore ( $\alpha_2$ -AR) (Bousquet et al., 1984); (Tibirica et al., 1988)). Brojnim biohemijskim i fiziološkim studijama do danas su identifikovana tri tipa imidazolinskih receptora (Ruiz et al., 2002):

- I<sub>1</sub>-imidazolinski receptori (I<sub>1</sub>-IR)
- I<sub>2</sub>-imidazolinski receptori (I<sub>2</sub>-IR)
- I<sub>3</sub>-imidazolinski receptori (I<sub>3</sub>-IR).

Ovi receptori su prisutni i u centralnom i u perifernom nervnom sistemu i zastupljeni su u različitim organima kao što su bubrezi, stomak, prostata, pluća i srce. I<sub>1</sub> imidazolinski receptori su uključeni u regulaciju nekoliko bioloških sistema, pri čemu je glavni centralna regulacija krvnog pritiska (Head and Mayorov, 2006). Sekvenca I<sub>2</sub>-imidazolinskog receptora pokazuje značajan stepen homologije sa MAO enzimom i smatra se da ovaj tip receptora ima ulogu u neuroprotekciji, analgeziji, odgovoru na stres i nastanku konvulzija ((Tesson et al., 1995), (Tesson et al., 1991)). I<sub>3</sub>-IRs imaju ulogu u indukciju sekrecije insulina iz  $\beta$ -ćelija pankreasa i održavanje homeostaze glukoze (Clews et al., 2010).

Osim navedenih, intenzivna istraživanja o imidazolinskim receptorima ukazuju i na druge primene imidazolinskih liganada kao što su:

- lečenje različitih vrsta tumora (Aceros et al., 2014); (Dupuy et al., 2004); (Separovic et al., 1996); (McLean et al., 2014); (Nikolic et al., 2013); (Srdic-Rajic et al., 2016)
- prevencija relapsa simptoma kokainske zavisnosti upotrebom I<sub>1</sub> agonista (Smith and Aston-Jones, 2011)
- Modulatorni efekti I<sub>2</sub> liganadi u analgeziji indukovanoj upotrebom opioida (Boronat et al., 1998)
- dijagnostifikovanju glioma upotrebom I<sub>2</sub>-IR liganada (Callado et al., 2004).

Imajući u vidu da većina liganada imidazolinskih receptora svoje efekte ostvaruje unutar centralnog nervnog sistema (CNS) delujući kao centralni antihipertenzivi i/ili su

potencijalni lekovi u lečenju neuroloških oboljenja, procena njihove permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) je od suštinskog značaja u ranom otkriću lekova.

Da bi se ispitala permeabilnost novih jedinjenja kroz KMB razvijen je veliki broj *in vivo*, *in vitro* i *in silico* metoda. Svaki od ovih modela ima svoje nedostatke i da bi se u potpunosti procenio transport lekova kroz KMB i razumeli mehanizmi uključeni u njihov prolazak, potrebno je kombinovati *in vitro* i *in vivo* tehnike, i ne oslanjati se isključivo na jednu metodu. Pored toga, *in silico* modeli mogu biti korisni u smanjenju velikog broja kandidat jedinjenja u manji broj 'hit' jedinjenja. Iako je direktno merenje permeabilnosti kroz KMB najpouzdanija metoda, ona predstavlja skup i dugotrajan proces. Takođe, veliki broj faktora, kao što su metabolizam i vezivanje za tkiva ili proteine plazme, utiče na distribuciju ispitivanih jedinjenja, tako da ova metoda ne daje uvek jasnu sliku o KMB permeabilnosti. Iz tih razloga razvijen je veliki broj *in vitro* modela ((**Abbott et al., 2006**); (**Abbott, 2004**); (**Gumbleton and Audus, 2001**)). Prednosti *in vitro* metoda su: ekonomičnost, jednostavnija priprema uzorka, dosta su brze i istovremeno se može ispitati veći broj jedinjenja u poređenju sa *in vivo* modelima, mogućnost procene mehanizma transporta, i identifikacija ranih znakova citotoksičnosti ako se koriste ćelijski modeli.

Najviše korišćene metode u farmaceutskoj industriji za predviđanje penetracije novih jedinjenja kroz KMB u ranoj fazi otkrića lekova ((Terasaki et al., 2003); (Garberg et al., 2005)) su:

- test permeabilnosti na veštačkim paralelnim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA)
- bioparticiona micelarna hromatografija (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC) (**Escuder-Gilabert et al., 2004**)
- hromatografija sa imobilisanim veštačkim membranama (eng. *Immobilized Artificial Membrane chromatography*, IAM) (**Yoon et al., 2006**)
- ćelijske metode (Caco-2, Madin-Darby ćelije psećeg bubrega (eng. *Mardin-Darby Canine Kidney*, MDCK) i mikrovaskularne endotelne ćelije goveđeg mozga (eng. *Primary Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells*, BBMEC))

Svega nekoliko studija je sprovedeno do danas sa ciljem da se ispita permeabilnost liganada imidazolinskih receptora kroz KMB i ispita kvantitativna veza između strukture i stepena permeabilnosti (**Vucicevic et al., 2009**). Međutim, u ovoj disertaciji prvi put je ispitana permeabilnost ovih jedinjenja koristeći dve različite *in vitro* tehnike (PAMPA i BMC) i na osnovu dobijenih vrednosti formirani su QSPR modeli za predviđanje



permeabilnosti liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i strukturno sličnih jedinjenja kroz KMB. Ovi modeli omogućavaju optimizaciju strukture novih potencijalnih lekova, derivate ispitivanih jedinjenja, i eliminaciju jedinjenja sa niskom permeabilnošću pre sinteze. Pokazano je da promene koje bi trebalo da poboljšaju KMB permeabilnost su: (1) uvođenje elektronegativnih atoma u aromatičnu strukturu, (2) supstitucija atoma broma ili hidroksilnih grupa njihovim izosterima (npr. fluorom ili hlorom), (3) uvođenje voluminoznijih grupa kao i atoma koji imaju visoku Sanderson elektronegativnost. Sa druge strane, prisustvo gvanidinske ili aminogvanidinske grupe, kao i metil i izobutil grupa pokazano je da ima negativan uticaj na KMB permeabilnost.

Nikolic i saradnici ((Nikolic et al., 2013)(Srdic-Rajic et al., 2016)) su ispitali antitumorski potencijal agonista i antagonista  $I_1$  imidazolinskog receptora na K562 ćelijskoj liniji. K562, ćelijska linija blastične faze hronične mijeloidne leukemije (*Chronic Myeloid leukemia*, CML), je neosetljiva na apoptozu indukovanu imatinibom i lekovima koji oštećuju DNK kao što je doksorubicin (De Oliveira et al., 2006). Pokazano je da samo rilmenidin, koji je snažan  $I_1$ -IR agonista, pokazuje proapoptotsku aktivnost na ovom tipu ćelije, dok su moksonidin, umereno efikasni  $I_1$ -IR agonista, i efaroksan, antagonista  $I_1$ -IR, neaktivni (Nikolic et al., 2013). Smatra se da rilmenidin inhibira rast K562 ćelija i dovodi do apoptoze kroz perturbaciju mitohondrijalnog puta. Ovaj lek značajno indukuje oštećenje membrane i deaktivira Ras/MAP kinazu ERK, p38 i JNK u K562 ćelijama (Srdic-Rajic et al., 2016). Upoređivanjem efekta jedinjenja **5**, selektovanog VS razvijenim u ovoj disertaciji, sa efektom rilmenidina (agoniste  $I_1$ -imidazolinskog receptora) na vijabilitet ((Aceros et al., 2014); (Srdic-Rajic et al., 2016)) i apoptozu K562 ćelija (Tabela 1), jedinjenje **5** je identifikovano kao novo hit jedinjenje.

**Tabela 1.** IC50 koncentracije liganada imidazolinskih receptora koji indukuju smrt ćelija K562 ćelijske linije

Jedinjenje	Antiproliferativna/Proapoptotska koncentracija ( $\mu$ M)
Rilmenidin	50
Moksonidin	>300
Efaroksan	-
<b>Jedinjenje 5</b>	<b>70</b>

Proapoptotska aktivnost jedinjenja **5** se manifestuje povećanjem broja ranih apoptotskih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 48 h kontinuiranog tretmana K562 ćelija uočeno je da je jedinjenje **5** (40%) dvostruko efikasnije od rilmenidina (20%) u

indukovanju ćelijske smrti. Citometrijskom analizom je primećeno da jedinjenje **5** dovodi do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi, smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa, kao i do značajnog smanjenja udela ćelija u S i G2/M fazi u odnosu na netretiranje ćelije (kontrolu).

Takođe, u prethodnim studijama je pokazano da kombinovani tretman rilmenidina i doksorubicina povećava stepen depolarizacije membrana, a samim tim i osetljivost K562 ćelija na apoptozu, kao i da rilmenidin svoju aktivnost ispoljava vezivanjem za nisharin i Rac1 signalni protein ((Srdic-Rajic et al., 2016)). Uočeni sinergistički efekat je značajan jer kombinovana terapija ova dva leka znatno povećava procenat apoptičnih ćelija nego kada se koristi doksorubicin sam (44% u odnosu na 10%). Međutim, za razliku od doksorubicina rilmenidin je bezbedan lek bez ozbiljnih neželjenih efekata čak i pri dozama mogo većim od terapijskih ((de Visser et al., 2001),(de Visser et al., 2002)).

Jedinjenjem **5** koje je kandidatkinja seletovala i sintetisala u okviru ove disertacije je korišćeno za tretiranje K562 ćelija, kao i doksorubicin pri  $IC_{50}$  1  $\mu$ M i njihova kombinacija, nakon čega je određen procenat apoptičnih ćelija protočnom citometrijom. Rezultati pokazuju da primena samo doksorubicina dovela jedino do povećanja procenta rano-apoptičnih ćelija i to 20%, dok tretman K562 ćelija kombinovanom primenom jedinjenja **5** i doksorubicina dovodi do značajnog povećanja populacije rano-apoptičnih ćelija i to 64% dok su populacije kasno-apoptičnih i nekrotičnih ćelija skoro nestale.

Pored studije sprovedene na K562 ćelijskoj liniji, pokazano je da imidazolinski antitumorsku aktivnost mogu ispoljiti i na drugim ćelijskim linijama. Zabeležena su proapoptotska dejstva moksonidina u fibroblastima i antiapoptotska u kardiomiocitima ((Aceros et al., 2014)). Takođe, *in vitro* studija na PC12 ćelijama je pokazala da benazolin, selektivni  $I_1$  agonista, dovodi do apoptoze koja je izazvana deprivacijom seruma delujući na  $I_1$ -IR i PC-PLC transdukcioni put, ali i da inhibira ćelijsku smrt indukovanu  $TNF\alpha$  (Dupuy et al., 2004). Imidazolinsko jedinjenje RX871024 indukuje smrt MIN6 ćelija koje luče insulin (Zaitseva et al., 2008). Drugi selektivni ligand  $I_1$ -IR, S43126, dovodi do dozno zavisne ćelijske smrti i formiranja apoptotskih tela u PC12 ćelijama nakon 72 h tretmana (McLean et al., 2014).

Ovi efekti ukazuju na potencijalne nove primene liganada imidazolinskih receptora u terapiji različitih maligniteta.

Prvobitne studije o  $I_1$ -IR signalnim putevima su se bazirale na hipotezi da ovaj receptor pripada familiji G protein kuplovanih receptora (eng. *G-Protein Coupled Receptors*, GPCRs). Ipak pokazano je da stimulisanjem goveđih ćelija nadbubrežne žlezde klonidinom

ne dolazi do akumulacije ni cAMP ni inozitol fosfata čime je ova tvrdnja opovrgnuta (**Regunathan et al., 1991**). Kasnije su Wu i saradnici uočili da I<sub>1</sub> ima uticaj na signalizaciju μ opioidnih receptora (MOR) koji su GPCR i koji kada se aktiviraju smanjuju aktivnost cAMP i ERK1/2 kao i ulazak Ca<sup>2+</sup> u ćelije (**Wu et al., 2006**). Zanimljivo je da agmatin, endogeni ligand I<sub>1</sub> receptora, inhibira naloksonom, antagonistom MOR, indukovano povećanje cAMP i Ca<sup>2+</sup> u opioidnim receptorima. Takođe, zabeleženo je da imidazolinski ligandi mogu da interaguju sa pojedinim podtipovima GPCR lipofosfolipidnih receptora i smatra se da dejstvo imidazolinskih receptora u PC12 ćelijama se dešava upravo aktiviranjem ovog tipa receptora (**Molderings et al., 2007**). Imajući u vidu da se imidazolinski ligandi pored imidazolinskih receptora koji su ciljno mesto njihovog dejstva vezuju i za GPCR receptore, u ovoj disertaciji je po prvi put primenjena metoda virtuelnog skrininga targeta (eng. *virtual target screening*) u cilju identifikacije novih 'off targets' ove grupe jedinjenja kao i jedinjenja **5** prethodno identifikovanog kao 'hit' za nisharin. Na osnovu dobijenih *in silico* rezultata beta adrenergički, dopaminski i muskarinski receptori su selektovani kao potencijalni 'off targeti' za određene ligande imidazolinskih i/ili α<sub>2</sub>-adrenergičkih receptora.

#### **CITIRANA LITERATURA:**

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>

Abbott, N.J., 2004. Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.014>

Aceros, H., Farah, G., Noiseux, N., Mukaddam-Daher, S., 2014. Moxonidine modulates cytokine signalling and effects on cardiac cell viability. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.047>

Baroni, M., Cruciani, G., Sciabola, S., Perruccio, F., Mason, J.S., 2007. A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. *Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): theory and application. J Chem Inf Model* 47, 279–294. <https://doi.org/10.1021/ci600253e>

Becke, A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* 98, 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>

Boronat, M.A., Olmos, G., García-Sevilla, J.A., 1998. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of

neurofilament proteins by idazoxan and other I2-imidazoline ligands. *Br. J. Pharmacol.* 125, 175–185. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702031>

Bousquet, P., Feldman, J., Schwartz, J., 1984. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 232–236.

Callado, L.F., Martín-Gómez, J.I., Ruiz, J., Garibi, J.M., Meana, J.J., 2004. Imidazoline I(2) receptor density increases with the malignancy of human gliomas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 785–787.

Clews, J., Morgan, N.G., Ramsden, C.A., 2010. ChemInform Abstract: Preparation of the I3 Imidazoline Receptor Antagonist KU14R and Related 2,3-Dihydrobenzo[b]furan Derivatives. *ChemInform* 32, no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.200146106>

Cross, S., Baroni, M., Carosati, E., Benedetti, P., Clementi, S., 2010. FLAP: GRID molecular interaction fields in virtual screening. validation using the DUD data set. *J Chem Inf Model* 50, 1442–1450. <https://doi.org/10.1021/ci100221g>

De Oliveira, F., Chauvin, C., Ronot, X., Mousseau, M., Lerverve, X., Fontaine, E., 2006. Effects of permeability transition inhibition and decrease in cytochrome c content on doxorubicin toxicity in K562 cells. *Oncogene* 25, 2646–2655. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209293>

de Visser, S.J., van der Post, J.-P., Nanhekhan, L., Schoemaker, R.C., Cohen, A.F., van Gerven, J.M.A., 2002. Concentration-effect relationships of two rilmenidine single-dose infusion rates in hypertensive patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 419–428. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.127638>

de Visser, S.J., van Gerven, J.M., Schoemaker, R.C., Cohen, A.F., 2001. Concentration-effect relationships of two infusion rates of the imidazoline antihypertensive agent rilmenidine for blood pressure and development of side-effects in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 51, 423–428. Di, L., Kerns, E.H., Fan, K., McConnell, O.J., Carter, G.T., 2003. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 223–232. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6)

Dupuy, L., Urosevic, D., Greney, H., Quaglia, W., Pignini, M., Brasili, L., Dontenwill, M., Bousquet, P., 2004. I1 imidazoline receptor-mediated effects on apoptotic processes in PC12 cells. *Cell Death Differ.* 11, 1049–1052. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401447>

Eglen, R.M., Hudson, A.L., Kendall, D.A., Nutt, D.J., Morgan, N.G., Wilson, V.G., Dillon, M.P., 1998. "Seeing through a glass darkly": casting light on imidazoline "I" sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 381–390.

Escuder-Gilabert, L., Molero-Monfort, M., Villanueva-Camañas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J., 2004. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 807, 193–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.004>

Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 1739–1749.  
<https://doi.org/10.1021/jm0306430>

Gumbleton, M., Audus, K.L., 2001. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 90, 1681–1698.

Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T., Banks, J.L., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* 47, 1750–1759.  
<https://doi.org/10.1021/jm030644s>

Head, G., Mayorov, D., 2006. Imidazoline Receptors, Novel Agents and Therapeutic Potential. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 4, 17–32.  
<https://doi.org/10.2174/187152506775268758>

Lee, null, Yang, null, Parr, null, 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev., B Condens. Matter* 37, 785–789.

Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., Tirado-Rives, J., 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 118, 11225–11236.  
<https://doi.org/10.1021/ja9621760>

Jorgensen, W.L., Tirado-Rives, J., 1988. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society* 110, 1657–1666.  
<https://doi.org/10.1021/ja00214a001>

McLean, L.S., Crane, L., Baziard-Mouysset, G., Edwards, L.P., 2014. Antiproliferative effect induced by novel imidazoline S43126 in PC12 cells is mediated by ROS, stress activated MAPKs and caspases. *Pharmacol Rep* 66, 937–945.

<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.003>

Molderings, G.J., Göthert, M., von Kügelgen, I., 2007. Characterization of an antiproliferative effect of imidazoline receptor ligands on PC12 cells. *Pharmacol Rep* 59, 789–794.

Nikolic, K., Veljkovic, N., Gemovic, B., Srdic-Rajic, T., Agbaba, D., 2013. Imidazoline-1 receptor ligands as apoptotic agents: pharmacophore modeling and virtual docking study. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 16, 298–319.

Radi, M., Vallerini, G.P., Petrelli, A., Vincetti, P., Costantino, G., 2013. A one-pot two-step microwave-assisted synthesis of N1-substituted 5,6-ring-fused 2-pyridones. *Tetrahedron Letters* 54, 6905–6908. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.10.054>

Regunathan, S., Evinger, M.J., Meeley, M.P., Reis, D.J., 1991. Effects of clonidine and other imidazole-receptor binding agents on second messenger systems and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochemical Pharmacology* 42, 2011–2018. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90602-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90602-2)

Ruiz, J., Barinagarrementeria, G., Martín-Gómez, J.I., Callado, L.F., Meana, J.J., 2002. Characterization of [ 3 H]idazoxan binding sites on human platelets. *Platelets* 13, 241–246. <https://doi.org/10.1080/0953371027000>

Schüller, A., Schneider, G., Byvatov, E., 2003. SMILIB: Rapid Assembly of Combinatorial Libraries in SMILES Notation. *QSAR & Combinatorial Science* 22, 719–721. <https://doi.org/10.1002/qsar.200310008>

Separovic, D., Kester, M., Ernsberger, P., 1996. Coupling of I1-imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* 49, 668–675.

Sirci, F., Goracci, L., Rodríguez, D., van Muijlwijk-Koezen, J., Gutiérrez-de-Terán, H., Mannhold, R., 2012. Ligand-, structure- and pharmacophore-based molecular fingerprints: a case study on adenosine A(1), A (2A), A (2B), and A (3) receptor antagonists. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26, 1247–1266. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9612-8>

Smith, R.J., Aston-Jones, G., 2011.  $\alpha(2)$  Adrenergic and imidazoline receptor agonists prevent cue-induced cocaine seeking. *Biol. Psychiatry* 70, 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.010>

Srdic-Rajic, T., Nikolic, K., Cavic, M., Djokic, I., Gemovic, B., Perovic, V., Veljkovic, N., 2016. Rilmenidine suppresses proliferation and promotes apoptosis via the mitochondrial pathway in human leukemic K562 cells. *Eur J Pharm Sci* 81, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.017>

Tesson, F., Limon-Boulez, I., Urban, P., Puype, M., Vandekerckhove, J., Coupry, I., Pompon, D., Parini, A., 1995. Localization of I2-imidazoline binding sites on monoamine oxidases. *J. Biol. Chem.* 270, 9856–9861.

Tesson, F., Prip-Buus, C., Lemoine, A., Pegorier, J.P., Parini, A., 1991. Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver. Major localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 155–160.

Tibirica, E., Feldman, J., Bousquet, P., 1988. Differences in the ability of yohimbine to antagonize the hypotensive effect of clonidine in normotensive and spontaneously hypertensive anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 1062–1066.

Veljkovic, V., Mouscadet, J.-F., Veljkovic, N., Glisic, S., Debyser, Z., 2007. Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.029>

Vučičević, K., Popović, G., Nikolic, K., Vovk, I., Agbaba, D., 2009. An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum HPLC Conditions for the Determination of 2-Arylimidazoline Derivatives. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32, 656–667. <https://doi.org/10.1080/10826070802711113>

Wu, N., Su, R.-B., Liu, Y., Lu, X.-Q., Zheng, J.-Q., Cong, B., Li, J., 2006. Modulation of agmatine on calcium signal in morphine-dependent CHO cells by activation of IRAS, a candidate for imidazoline II receptor. *European Journal of Pharmacology* 548, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.013>

Yoon, C.H., Kim, S.J., Shin, B.S., Lee, K.C., Yoo, S.D., 2006. Rapid Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Drugs Using the Immobilized Artificial Membrane Phosphatidylcholine Column Chromatography. *Journal of Biomolecular Screening* 11, 13–20. <https://doi.org/10.1177/1087057105281656>  
Zaitseva, I.I., Størling, J., Mandrup-Poulsen, T., Berggren, P.-O., Zaitsev, S.V., 2008. The imidazoline RX871024 induces death of proliferating insulin-secreting cells by activation of c-jun N-terminal kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1248–1255. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7564-x>

#### **4 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

##### **Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:**

1. Jelica Vucicevic, Katarina Nikolic, Vladimir Dobričić, Danica Agbaba. Prediction of Blood-Brain Barrier Permeation of  $\alpha$ -Adrenergic and Imidazoline Receptor Ligands using PAMPA technique and Quantitative-Structure Permeability Relationship analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12/2014; 68., DOI:10.1016/j.ejps.2014.12.014 **M21**
2. Jelica Vucicevic, Tatjana Srdic-Rajic, Marco Pieroni, Jonne MM Laurila, Vladimir Perovic, Sabrina Tassini, Elisa Azzali, Gabriele Costantino, Sanja Glisic, Danica Agbaba, Mika Scheinin, Katarina Nikolic, Marco Radi, Nevena Veljkovic. A Combined Ligand- and Structure-Based approach for the identification of rilmenidine-derived compounds which synergize the antitumor effects of doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 05/2016; 24(14)., DOI:10.1016/j.bmc.2016.05.043 **M21**
3. Jelica Vucicevic, Marija Popovic, Katarina Nikolic, Slavica Filipic, Darija Obradovic, Danica Agbaba. Use of biopartitioning micellar chromatography and RP-HPLC for the determination of blood–brain barrier penetration of  $\alpha$ -adrenergic/imidazoline receptor ligands, and QSPR analysis. *SAR and QSAR in Environmental Research* 03/2017; 28(3):235-252., DOI:10.1080/1062936X.2017.1302506 **M21**

#### **5 ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ovu doktorsku disertaciju čine tri celine čiji će rezultati imati potencijalni značaj za razvoj novih liganda imidazolinskih receptora koji se mogu koristiti u različite terapijske svrhe.

Prvu celinu čini *in vitro* procena permeabilnosti kroz KMB liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i CNS lekova primenom PAMPA i bioparticione micelarne hromatografije. QSPR/QSRR analizom ovih rezultata formirani su modeli koji se mogu koristiti kao brze skrining alatke za procenu KMB permeabilnosti novih jedinjenja pre njihove sinteze. Na osnovu modela identifikovane su i funkcionalne grupe jedinjenja koje imaju najveći uticaj na njihovu KMB permeabilnost. Pokazano je da promene koje bi trebalo da poboljšaju permeabilnost su: (1) uvođenje elektronegativnih atoma u aromatičnu strukturu, (2)



supstitucija atoma broma ili hidroksilnih grupa njihovim izosterima (npr. fluorom ili hlorom), (3) uvođenje voluminoznijih grupa kao i atoma koji imaju visoku Sanderson elektronegativnost. Sa druge, strane prisustvo gvanidinske ili aminogvanidinske grupe, kao i metil i izobutil grupa pokazano je da ima negativan uticaj na KMB permeabilnost.

Na osnovu dobijenih PAMPA rezultata imidazolini su klasifikovani u 3 grupe:

- jedinjenja sa visokom permeabilnošću kroz KMB (efaroksan, gvanabenz, gvanfacin, harman, harmin, idazoksan, ksilometazolin, nafazolin i rilmenidin)
- jedinjenja sa niskom permeabilnošću kroz KMB (brimonidin, moksonidin, agmatin i amilorid)
- jedinjenja koja se ne mogu klasifikovati ni u jednu od ove dve grupe (klonidin, oksimetazolin, tetrahidrozolin, tizanidin i tramazolin)

Pored PAMPA i BMC metoda, retenciono ponašanje liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS je ispitano primenom konvencionalne RP-HPLC metode. Iako su retencioni faktori dobijeni u ovom sistemu pokazali nisku korelaciju sa eksperimentalnim  $\log BB$  vrednostima, uočena je visoka korelacija sa eksperimentalno dobijenim  $\log P$  vrednostima i  $\log P$  vrednostima dobijenim koristeći ACD/i-Lab softver. Stoga se smatra da se ovaj retencioni faktor može koristiti kao pouzdan parametar lipofilnosti liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS.

Drugu celinu čini ispitivanje odnosa između strukture jedinjenja i aktivnosti koji leži u osnovi proapoptotske aktivnosti rimenidina. Identifikovana su nova jedinjenja sa drugačijom hemijskom strukturom, a koja pokazuju aktivnost i mehanizam dejstva kao i rilmenidin. U cilju identifikacije novih jedinjenja razvijen je VS protokol koji uključuje filtriranje baze na osnovu vrednosti AQVN deskriptora koji se računa za dalekosežne međumolekulske interakcije organskih molekula i primenu kombinovanih metoda virtuelnog skrininga koje su zasnovane na ligandu (rilmenidinu) i strukturi proteina (nisharina).

Od 11 kandidata selektovanih ovom metodom, *in vitro* testiranjima je pokazano je da jedinjenje **5** najaktivnije i da je njegova citotoksična aktivnost slična rilmenidinu. Ovo jedinjenje dovodi do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi i smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa. Pored apoptotske aktivnosti ispitana je i antiproliferativna aktivnost jedinjenja **5** gde je uočena značajna inhibicija formiranja kolonija K562 ćelija na dozno zavisani način. Ni jedno od 11 selektovanih i sintetisanih jedinjenja nije pokazalo značajan afinitet na rekombinantnim humanim  $\alpha_{2A}$  adrenergičkim receptorima, što ukazuje na njihovu selektivnost.

Jedinjenje **5** je pokazalo i jaku sinergističku aktivnost sa doksorubicinom u indukovanju apoptoze u poređenju sa samim doksorubicinom. Ovo ukazuje na mogućnost korišćenja jedinjenja **5** i njegovih derivata u daljim ispitivanjima slabo poznatih I<sub>1</sub>-IR signalnih puteva ili kao polaznih jedinjenja za razvoj adjuvantnih agenasa koji se mogu koristiti u konvencionalnim terapijama za lečenje tumora koju imaju smanjenu osetljivost na lekove slične doksorubicinu.

Treću celinu disertacije čini otkrivanje novih *off-targeta* liganada  $\alpha_2$ -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora primenom inverznog dokinga. Identifikovano je nekoliko GPCR receptora koji su potencijalni '*off target-i*' imidazolinskih liganada. Beta adrenergički, dopaminski i muskarinski receptori su selektovani kao potencijalni '*off targeti*' za određene ligande imidazolinskih i/ili  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora kao što su BDF6143, BU224, BU226, ksilometazolin i jedinjenje **5**. Dobijeni rezultati mogu biti korisni u razumevanju potencijalnih neželjenih efekata ovih jedinjenja, ili u pronalaženju njihovih novih terapijskih primena.

## **Predlog Komisije**

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat Jelica Vučićević, magistar farmacije, uspešno realizovala postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutsko-medicinske hemije i strukturne analize.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 3 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju Jelice Vučićević, magistra farmacije, i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

**„Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje proapoptotske aktivnosti novih liganada imidazolinskih receptora“**

Članovi Komisije:

1. \_\_\_\_\_

Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor, mentor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. \_\_\_\_\_

Dr Nevena Veljković, naučni savetnik, mentor,  
Institut za nuklearne nauke Vinča

3. \_\_\_\_\_

Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. \_\_\_\_\_

Dr. sc. Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik,  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

U Beogradu, 10.10.2019.