

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 аминокинолинску фармакофору, значајно доприноси активности једињења. Показан је повољан утицај цијано-групе на ароматичном носачу аминокинолинске фармакофоре и метиловања бензилног амина на антималаријску 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*. Делимична редукција хинолинског прстена није допринела побољшању активности, као ни везивање имидазопиперазинског прстена за аминокинолинску фармакофору.

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

Додатно, тиофенски деривати 4-аминокинолина и 5,6,7,8-тетрахидрохинолина 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, аминокинолински 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 антималаријске 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 антимальарика, упркос широкој распрострањености резистентних сојева *Plasmodium* паразита према хлорокину, антимальарику 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 антимальарика показала су да једињења код којих је алкил-низом повезана аминахинолинска фармакофора за ароматични носач исказују

значајну *in vitro* антималяријску активност према хлорокин-осетљивим и хлорокин-резистентним сојевима *P. falciparum*, уз остваривање инхибиције β -хематина. Показало се да увођење додатног π -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 β -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 аминохинолина 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 малигних 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 малигног 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) **IF₂₀₁₇ = 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) **IF₂₀₁₇ = 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 аминокиселина 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