

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 12-16

11000 Београд, Србија

Наставно-научном већу Хемијског факултета у Београду

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидаткиње **Андриане И. Стоилковић**, мастер хемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 12. јуна 2025. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидаткиње **Андриане И. Стоилковић**, мастер хемичара, студента докторских студија на Хемијском факултету, пријављене под насловом:

„Хибриди 4-аминохинолина и 1,4-бензохинона као *in vitro* инхибитори холинестераза и пролиферације туморских ћелија “

На основу увида у поднету документацију и досадашњи рад кандидаткиње, Комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидаткињи

Андриана И. Стоилковић, мастер хемичар, рођена је у Врању, 20. 2. 1997. године. Завршила је Гимназију „Бора Станковић” у Врању. Хемијски факултет Универзитета у Београду је уписала 2016. године. Основне академске студије завршила је 2021. године, на студијском програму Хемија. Завршни рад на тему „Амидни деривати 4-аминохинолина као реверзибилни инхибитори ацетилхолин- и бутирилхолин-естераза“ одбранила је на Катедри за органску хемију, под менторством др Душана Сладића и др Дејана Опсенице. Мастер академске студије је завршила 2022. године на студијском програму Хемија. Мастер рад на тему „Синтеза деривата хидроксихлорокина са електрон-сиромашним хинолинским језгром“ је одбранила на Катедри за органску хемију, под менторством др Душана Сладића и др Дејана Опсенице. Докторске академске студије је уписала у октобру 2022. године на

Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм Хемија, на Катедри за органску хемију, под менторством др Дејана Опсенице и др Марија Златовића.

Андриана Стоилковић је запослена на Институту за хемију, технологију и металургију-институт од националног значаја за Републику Србију (ИХТМ), као истраживач приправник од октобра 2022. године.

Научно-истраживачки рад Андриане Стоилковић на докторским академским студијама обухвата дизајн, синтезу и карактеризацију нових хибрида деривата 4-аминохинолина и 1,4-бензохинона са двоструком наменом, као *in vitro* инхибитора активности холинестераза (ChE) и пролиферације туморских ћелија .

Члан је Српског хемијског друштва и Клуба младих хемичара Србије.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Андриана Стоилковић је коаутор 1 научног рада објављеног у истакнутим часописима међународног значаја (M21) и 2 саопштења на скуповима националног значаја штампаних у изводу (M64).

У Прилогу 1 овог извештаја дата је библиографија кандидаткиње, категорисана према критеријумима Министарства науке, технолошког развоја и иновација.

В. Образложење теме

1. Научна област: Хемија

Ужа научна област: Органска хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је развој нових хибрида деривата 4-аминохинолина и 1,4-бензохинона са двоструком наменом, као *in vitro* инхибитора активности холинестераза (ChE) и пролиферације туморских ћелија . Истраживање у оквиру ове тезе чиниће три целине.

У првом делу истраживања радиће се на дизајну и синтези нових хибрида са две привилеговане фармакофоре међусобно повезане линкером – 4-аминохинолинско језгро и 1,4-бензохинонски прстен. У складу са резултатима биолошке активности и молекулског моделовања интеракција ензим–супстрат (molecular docking), биће остварен развој једињења, који подразумева промену структуре линкера и структуре хинолинског и бензохинонског дела молекула.

Други део истраживања ће обухватити *in vitro* тестирање синтетисаних једињења према више идентификованих мета у симптоматској терапији Алцхајмерове болести, као што су *in vitro* инхибиторна активност према ацетилхолин- (AChE) и бутирилхолин-естеразама (BChE), њихова *in vitro* антиоксидативна активност и способност хелатације Zn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} јона.

У оквиру трећег дела истраживања биће извршено *in vitro* тестирање синтетисаних једињења према више туморских ћелијских линија и за најактивнија једињења биће урађене анализе ћелијског циклуса и ћелијске смрти (апоптоза).

3. Циљ научног истраживања

Циљеви овог истраживања су:

- 1) Синтеза нових хибрида деривата 4-аминохинолина и 1,4-бензохинона, која подразумева примену реакција познатих у литератури и оптимизацију синтетских путева.
- 2) Испитивање биолошке активности синтетисаних једињења, које обухвата одређивање *in vitro* инхибиторне активности према а) ацетилхолин-естерази и бутирилхолин-естерази, мерење *in vitro* антиоксидативне активности и испитивање способности хелатације биометала и б) *in vitro* инхибиције пролиферације туморских ћелија.
- 3) Анализа физичко-хемијских особина синтетисаних деривата, одређених *in silico* методама, које указују на потенцијал примене као лека.
- 4) Молекулски докинг синтетисаних лиганата у структуру ChE што омогућава рационализацију експерименталних резултата инхибиторне активности и анализу односа структура–активност.

4. Методе истраживања

Током израде ове докторске дисертације користиће се стандардне лабораторијске технике и методе органске синтезе описане у литератури. Биће примењене реакције као што су трансформације функционалних група, реакције стварања везе угљеник–хетероатом, и реакције супституције на хетероцикличном и 1,4-бензохинонском језгру. Зависно од природе супстрата и реакционих услова, по потреби ће се вршити привремена заштита функционалних група.

Пречишћавање добијених производа вршиће се стандардним лабораторијским методама и њихова структура ће бити одређена применом 1D и 2D метода нуклеарне

магнетне резонанције (NMR ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC), инфрацрвене спектроскопије (FTIR) и масене спектрометрије високе резолуције (HRMS). Биће испитана чистоћа синтетисаних једињења високоефикасном течном хроматографијом (HPLC), пре одређивања биолошке активности.

Инхибиторне активности синтетисаних деривата према комерцијално доступним ацетилхолин- и бутирилхолин-естеразама, биће одређене у *in vitro* условима користећи Ellman-ову (Ellman) методу. Активности ензима ацетилхолин-естеразе и бутирилхолин-естеразе биће мерене при различитим концентрацијама ацетилтиохолина, без испитиваних једињења и у њиховом присуству у различитим концентрацијама, изабраним тако да активност ензима буде инхибирана у обиму од 20% до 80%. За одређивање *in vitro* антиоксидативне активности користиће се FRAP („ferric reducing antioxidant power”) тест. Жобовом (Job) методом, поређењем одговарајућих UV-Vis спектра биће испитана способност хелатације биометала (Fe^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+}).

У *in vitro* условима биће одређене инхибиторне активности синтетисаних деривата према туморским ћелијским линијама HeLa (туморска ћелијска линија рака грлића материце), A549 (туморска ћелијска линија рака плућа), LS174 (туморска ћелијска линија рака дебелог црева) као и MRC5 ћелијској линији здравих ћелија. За испитивање активности према туморским и здравим ћелијама биће коришћена MTT метода, а анализа ћелијског циклуса и смрти ћелија ће бити урађена проточном цитометријом (flow cytometry).

Физичко-хемијске особине и структурни дескриптори за предвиђање сличности синтетисаних једињења лековима („druglikeness”), као и за предвиђање проласка кроз крвно–мождану баријеру, биће одређене *in silico* методама доступним на једном од сервиса (SwissADME, ADMETlab 2.0., Chemicalize). Реверснофазном високоефикасном танкослојном хроматографијом ће бити одређена липофилност синтетисаних једињења.

Пре молекулског моделовања интеракција ензим–супстрат, структуре супстрата ће бити креиране користећи одговарајуће протоколе у програму Maestro програмског пакета Schrödinger Suite. За молекулске докинг студије, структуре ензима ће бити припремљене полазећи од кристалних структура ацетилхолин-естеразе и бутирилхолин-естеразе доступних на платформи Protein Data Bank (AChE PDB ID: 4EY4; BChE PDB ID: 6EQP).

5. Актуелност проблематике у свету

Алцхајмерова болест је сложен неуродегенеративни поремећај и сматра се најчешћим узроком деменције, којом је према подацима Светске здравствене организације погођено 55,2 милиона људи, са порастом броја случајева за 188% од 2000. године.¹ Алцхајмерова болест је прогресивно и фатално обољење, које одликује оштећење или смрт нервних ћелија. Последице су промене у možданом ткиву и симптоми као што су губитак памћења, губитак говора, депресија, поремећаји у понашању и друго.² Тачан узрок појаве ове болести до данас није поуздано утврђен, и не постоји терапија која лечи узроке обољења или доводи до потпуног излечења пацијента. Лекови који се примењују у лечењу Алцхајмерове болести ограничени су на ублажавање симптома и побољшање стања пацијената.² Најважнија патолошка обележја Алцхајмерове болести су: формирање β -амилоидних ($A\beta$) плакова, смањење концентрације неуротрансмитера ацетилхолина, хиперфосфорилација и акумулација тау-протеина, нарушавање хомеостазе биометала и оксидативни стрес.³ Од четири одобрена лека за третман когнитивних поремећаја, три су инхибитори ацетилхолин-естеразе, ензима одговорног за хидролизу ацетилхолина, и овај ензим представља фаворизовану мету у третману Алцхајмерове болести.³ Активно место ацетилхолин-естеразе састоји се из каталитичког активног места („catalytic active site”, CAS) и периферног анјонског места („peripheral anionic site”, PAS). Осим основне улоге да хидролизује ацетилхолин овај ензим доприноси и настанку $A\beta$ -плакова, преко PAS.³ Бутирилхолин-естераза је друга холинестераза присутна код људи, са још увек недовољно разјашњеном физиолошком улогом. Утврђен је повишен ниво овог ензима у možданом плаку код пацијената у одмаклој фази болести, као и бржи пораст концентрације у односу на ацетилхолин-естеразу током прогресије болести, што га чини новом метом за развој лекова.³ Код пацијената оболелих од Алцхајмерове болести уочене су повећане концентрације јона Cu^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+} и утврђена је повезаност са формирањем $A\beta$ -плакова који служе као њихов депо. Такође, јони метала су редокс-активне врсте, и у присуству $A\beta$ плакова генеришу кисеоничне радикале који су одговорни за оксидативни стрес.³ Због сложене етиологије болести, јавља се потреба за развојем лекова који би били усмерени према више мета деловања („multy-target directed ligand”, MTDL).⁴ Такви лекови би требало да инхибирају активност холинестераза, да буду способни да се истовремено вежу за CAS и PAS ацетилхолин-естеразе, да изврше хелатацију јона метала укључених у хомеостазу и да имају антиоксидативну активност.

Главни фактор који спречава успешно лечење пацијената оболелих од рака је развој резистенције ћелија рака на хемиотерапеутике.⁵ Механизми резистенције на лекове укључују: прекомерну експресију трансмембранских пумпи за избацивање лекова, промене структуре мета лекова и слаба индукција ћелијске смрти. Поред урођене резистенције која се развија током канцерогенезе, иницијално осетљиве туморске ћелије могу развити стечену резистенцију након примене појединачног хемиотерапеутика. Појава фенотипа вишеструке резистенције на лекове (multidrug resistance, MDR) озбиљна је препрека за ефикасно лечење рака.

4-Аминохиолинско језгро и 1,4-бензохинонска структура припадају групи привилегованих фармакофора које се дуги низ година користе као модели за дизајн и развој лекова. Деривати аминохиолина су до данас показали широк спектар биолошке активности: антималаријску, антибактеријску, антивирусну и антифунгалну.⁶ У литератури је забележена инхибиторна активност 4-аминохиолина према ацетилхолин- и бутирилхолин-естеразама, што представља перспективан структурни мотив за развој нових активних инхибитора.⁷ Хинони су познати по свом антиоксидативном потенцијалу, третману хепатитиса Ц, Паркинсонове болести, ретинопатије и Ретовог (Rett) синдрома.⁸ Бројни изоловани и синтетисани хинони показали су антитуморску активност према различитим ћелијским линијама рака укључујући и оне отпорне на више лекова (multidrug-resistant cell lines).⁹ Осим тога, деривати хинона показују наномоларну активност према АСhЕ и микромоларну активност према бета-секретази (BACE1), А β -самоагрегацији и А β -агрегацији индукованој АСhЕ.¹⁰

6. Очекивани резултати

Кандидаткиња Андриана Стоилковић ће у току израде докторске дисертације развити и оптимизовати синтетски пут за добијање нових хибрида 4-аминохиолина и 1,4-бензохинона. Применом реакција познатих у литератури, кандидаткиња ће испитати и по потреби модификовати реакционе услове, у сврху ефикасније синтезе. Очекује се да добијени деривати покажу инхибиторну активност према ацетилхолин-естерази и бутирилхолин-естерази у *in vitro* тестирању, *in vitro* антиоксидативну активност и способност хелатације биометала. Вршиће се и *in vitro* тестирање утицаја синтетисаних једињења на пролиферацију више туморских ћелијских линија а за најактивнија једињења биће урађене анализе ћелијског циклуса и ћелијске смрти (апоптоза). Анализом односа

структура–активност, добијањем резултата молекулског моделовања интеракција ензим–супстрат и *in silico* одређивањем физичко-хемијских особина синтетисаних једињења, очекује се рационални развој нове серије хибрида 4-аминохинолина и 1,4-бензохинона.

7. Литература

- [1] A blueprint for dementia research. Geneva: World Health Organization; **2022**, ISBN 978-92-4-005824-8.
- [2] Sharma, P., Srivastava, P., Seth, A., Tripathi, P.N., Banerjee, A.G., Shrivastava, S.K. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies, *Prog. Neurobiol.* **2019**, *174*, 53–89.
- [3] Huang, X., Moir, R. D., Tanzi, R. E., Bush, A. I., Rogers, J T. Redox-Active Metals, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease Pathology, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1012*, 153–163.
- [4] Martins M. M., Branco P. S., Ferreira L. M., Enhancing the Therapeutic Effect in Alzheimer's Disease Drugs: The role of Polypharmacology and Cholinesterase Inhibitors, *ChemistrySelect*, **2023**, *8*, e202300461.
- [5] Holohan C., van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G., Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, **2013**, *13*, 714-726.
- [6] Senerovic, L., Opsenica, D., Moric, I., Aleksic, I., Spasić, M., Vasiljevic, B. (2019). Quinolines and Quinolones as Antibacterial, Antifungal, Anti-virulence, Antiviral and Anti-parasitic Agents. In: Donelli, G. (eds) *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1282. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2019_428.
- [7] Matošević A., Bartolić M., Maraković N., Zandona A., Petrić R., Opsenica D., Bosak A., Synthesis and biological evaluation of novel aminoquinolines with an n-octyl linker: Impact of halogen substituents on C(7) or a terminal amino group on anticholinesterase and BACE1 activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2024**, *112*, 129928.
- [8] Benzoquinones: <https://go.drugbank.com/categories/DBCAT001600> (pristupljeno 27. maj 2025).
- [9] Jeremić M., Pešić M., Dinić J., Banković J., Novaković I., Šegan D., Sladić D., Simple avarone mimetics as selective agents against multidrug resistant cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *118*, 107-120

[10] Campora M., Francesconi V., Silvia Schenone, Bruno Tasso, Michele Tonelli, Journey on Naphthoquinone and Anthraquinone Derivatives: New Insights in Alzheimer's Disease, *Pharmaceuticals*, **2021**, 14, 33.

Г. Закључак

На основу изложеног, Комисија сматра да је предложена тема научно заснована и актуелна, а очекивани резултати би представљали научни допринос и напредак у области органске и медицинске хемије. Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да кандидаткињи **Андриани И. Стоилковић**, мастер хемичару, одобри израду докторске дисертације под насловом:

„Хибриди 4-аминохинолина и 1,4-бензохинона као *in vitro* инхибитори холинестераза и пролиферације туморских ћелија “

За менторе се предлажу др Марио Златовић, редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета и др Дејан Опсеница, научни саветник Универзитета у Београду - ИХТМ-а. Списак радова предложених ментора који их квалификују за вођење докторске дисертације дат је у **Прилогу 2** овог извештаја.

У Београду, дана 10. 10. 2025.

Комисија:

др Душан Сладић, професор емиритус
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Марио Златовић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Дејан Опсеница, научни саветник
Универзитет у Београду - ИХТМ

Прилог 1: Библиографија кандидаткиње, категорисана према критеријуму Министарства науке, технолошког развоја и иновацијате Републике Србије

Радови објављени у истакнутим часописима међународног значаја (M21):

1. Matošević, A.; Opsenica, D.M.; Bartolić, M.; Maraković, N.; Stoilković, A.; Komatović, K.; Zandona A.; Žunec, S.; Bosak, A. Derivatives of Amodiaquine as Potent Human Cholinesterases Inhibitors: Implication for Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecules* **2024**, 29, 5357, DOI: 10.3390/ molecules29225357

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

1. Stoilković, A.; Matošević, A.; Komatović, K.; Bartolić, M.; Opsenica, D.M.; Bosak, A. *Synthesis and biological evaluation of amodiaquine derivatives as inhibitors of human cholinesterase*, 10th Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, 26 October **2024**, Book of Abstracts CB PP 12, page 50; ISBN 978-86-7132-087-0, Publisher: Serbian Chemical Society.
2. Stoilković, A.; Komatović, K.; Sladić, D.; Opsenica, D. *Amide derivatives of 4-aminoquinoline as reversible inhibitors of acetylcholine- and butyrylcholine-esterase*, 8th Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, 29 October **2022**, Book of Abstracts OC PP 13, page 120; ISBN 978-86-7132-080-1, Publisher: Serbian Chemical Society.

Прилог 2: Подаци о менторима

Име и презиме ментора: **др Марио Златовић**

Звање: **редовни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. V. Ribić, A. Rečnik, M. Komelj, A. Kokalj, Z. Branković, M. Zlatović, G. Branković, A new type of inversion boundary in Sb-doped ZnO predicted by DFT calculations and confirmed by experimental HRTEM, *Acta Mater.*, **2020**, 199, 633-648, (<https://doi.org/10.1016/j.actamat.2020.08.035>)
2. I. Grubiša, M. Janković, N. Nikolić, V. Jaksić, D. Risimić, M. Mavija, M. Stamenković, M. Zlatović, J. Milašin Novel TEAD1 gene variant in a Serbian family with Sveinsson's chorioretinal atrophy. *Exp. Eye Res.*, **2021**, 207, 108575 (<https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108575>)
3. M. Stojanović, I. Lukić, E. Marinković, A. Kovačević, R. Miljković, J. Tobias, I. Schabussova, M. Zlatović, Talin Barisani-Asenbauer, Ursula Wiedermann, Aleksandra Inić-Kanada, Cross-Reactive Effects of Vaccines: Heterologous immunity between tetanus and Chlamydia, *Vaccines*, **2020**, 8, 719, (<https://doi.org/10.3390/vaccines8040719>)
4. L. Berberina, M. Zlatović, M. Nikolić, S. Stojanović, Computational aynalysis of non-covalent interactions in phycocyanin subunit interfaces, *Mol. Inf.*, **2019**, 38, 1800145 (<https://doi.org/10.1002/minf.201800145>)
5. V. R. Ribić, S. Đ. Stojanović, M. V. Zlatović, Anion- π interactions in active centers of superoxide dismutases. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 106, 559–568, (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.050>)

Име и презиме ментора: **др Дејан Опсеница**

Звање: **научни саветник**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. A. Matošević, M. Bartolić, N. Maraković, A. Zandona, R. Petrić, D. Opsenica, A. Bosak, Synthesis and biological evaluation of novel aminoquinolines with an n-octyl linker: Impact of halogen substituents on C(7) or a terminal amino group on anticholinesterase and BACE1 activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2024**, *112*, 129928. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2024.129928>
- 2.* A. Matošević, D. M. Opsenica, M. Bartolić, N. Maraković, A. Stoilković, K. Komatović, A. Zandona, S. Žunec, A. Bosak, Derivatives of Amodiaquine as Potent Human Cholinesterases Inhibitors: Implication for Treatment of Alzheimer's Disease, *Molecules*, **2024**, *29*, 5357. <https://doi.org/10.3390/molecules29225357>
3. A. Matošević, D. M. Opsenica, M. Spasić, N. Maraković, A. Zandona, S. Žunec, M. Bartolić, Z. Kovarik, A. Bosak, Evaluation of 4-aminoquinoline derivatives with an n-octylamino spacer as potential multi-targeting ligands for the treatment of Alzheimer's disease, *Chemico-Biological Interactions*, **2023**, *382*, 110620. (<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110620>)
4. N. Kaličanin, G. Kovačević, M. Spasojević, O. Prodanović, S. Jovanović-Šanta, D. Škorić, D. Opsenica, R. Prodanović, Immobilization of ArRMut11 omega-transaminase for increased operational stability and reusability in the synthesis of 3 α -amino-5 α -androstan-17 β -ol, *Process Biochem. (Oxford, U.K.)*, **2022**, *121*, 674–680. (<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.08.016>)
5. A. Bosak D. M. Opsenica, G. Šinko, M. Zlatar, Z. Kovarik, Structural aspects of 4-aminoquinolines as reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Chem.-Biol. Interact.*, **2019**, *308*, 101–109. (<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.024>)

* Рад није део докторске тезе кандидаткиње.
