

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 кандидата Милоша Јовића, мастер хемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 11. априла 2024. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата Милоша Јовића, мастер хемичара, студента докторских студија, пријављене под насловом:

„Синтеза нових N-хетероцикличних инхибитора тиоредоксин-редуктаза као потенцијалних антитуморских агенаса”

На основу увида у поднету документацију и досадашњи рад Милоша Јовића, подносимо Наставно–научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Милош Јовић рођен је 20. јануара 1998. године у Београду. Основну школу и гимназију завршио је са одличним успехом у Старој Пазови. Универзитет у Београду – Хемијски факултет, студијски програм Хемија, уписао је школске 2016/17. године. Дипломирао је 2020. године са просечном оценом 9,25 и оценом 10 на завршном раду који је урадио на Катедри за органску хемију. Мастер академске студије на Хемијском факултету, студијски програм Хемија, уписао је школске 2020/21. године, а завршио 2021. године са просечном оценом 9,23 и оценом 10 на мастер раду који је урадио на Катедри за

органску хемију. Докторске академске студије на истом факултету, студијски програм Хемија, уписао је школске 2021/22. године на Катедри за органску хемију.

Од 2022. године запослен је на Иновационом центру Хемијског факултета као истраживач-приправник. Учествовао је у реализацији лабораторијских вежби из предмета Органска хемија за студенте Биолошког факултета Универзитета у Београду у школској 2021/22 и 2023/24 години.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Милош Јовић је коаутор једног рада у истакнутом међународном часопису (M22):

(M22) – Научни рад у истакнутом међународном часопису

Branislav Kokić, Bojan Vulović, Miloš Jović, Ana Andrijević, Vladimir Ajdačić, Igor M. Opsenica. Strategies for Carbon Electrophile Addition to Carbonyls and Imines by Cobalt Catalysis. *Eur. J. Org. Chem.* **2023**, 26, e202300997.

<https://doi.org/10.1002/ejoc.202300997>

M22, Chemistry, Organic (16/53), IF2022 = 2,8.

В. Образложење теме

1. Научна област: Хемија

Ужа научна област: Органска хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације биће синтеза електрофилних N-хетероцикличних једињења (хетероциклична једињења која садрже азот у прстену) која садрже структурне мотиве 3-тропенона, пиридина, триазола, трифенилфосфина и тетраминске киселине, и испитивање њихове антитуморске активности у ћелијама карцинома, посебно карцинома плућа.

3. Циљ научног истраживања

У оквиру ове докторске дисертације планирана је синтеза нових деривата који у својој структури садрже 3-тропенонски скелет, алкилтрифенилфосфонијум-катјонски центар, пиридин-арилсулфонатни мотив и мотив тетраминске киселине. Деривати 3-тропенона биће синтетисани у реакцији [5+2] циклоадиције, уз употребу оксопиридијумских катјона и *p*-хидроксиметил-*N*-фенилмалеимида, као и његових деривата. Замена бензилне хидроксилне групе у 3-тропенонској структури извршиће се њеним превођењем у одговарајући мезилат, који ће у реакцији нуклеофилне супституције са трифенилфосфином дати одговарајућу фосфонијумску со. Бензилна алкохолна функционална група биће и естерификована употребом етаноил-хлорида и 4-хлорбутаноил-хлорида, при чему ће се производ који садржи алкил-хлоридни мотив даље трансформисати у реакцији нуклеофилне супституције са трифенилфосфином. Синтеза деривата са пиридин-сулфонилним мотивом полазиће од комерцијално доступног 2-хлор-6-метокси-3-нитропиридина, чија ће метокси-група бити трансформисана до хидроксилне помоћу концентроване хлороводоничне киселине. Тако добијена хидроксилна група биће пропаргилована уз употребу пропаргил- бромида. Даља дериватизација добијеног једињења вршиће се реакцијом [3+2] циклоадиције („клик“ реакцијом) катализованом комплексним једињењима бакра на пропаргилном мотиву, као и заменом хлора у положају C2 4-хлорфенилсулфинатом нуклеофилном ароматичном супституцијом. Употребом диазидаолкана у двострукој „клик“ реакцији биће синтетисане одговарајуће димерне структуре са хлором или хлорфенилсулфонатним супституентом у положају C2 пиридина. Деривати тетраминске киселине биће синтетисани у реакцији алдолне кондензације са одговарајућим хетероцикличним и полихалогенованим арил-алдехидима. Добијеним дериватима затим ће бити испитана биолошка активност у ћелијама карцинома, нарочито карцинома плућа.

4. Методе истраживања

Приликом израде докторске дисертације биће коришћене стандардне лабораторијске методе и технике органске хемије. Одговарајући деривати 3-тропенона, пиридина и тетраминске киселине биће добијени из комерцијално доступних хемикалија у реакцијама

[5+2] циклоадиције, нуклеофилне ароматичне супституције и алдолне кондензације. Пропаргиловани деривати пиридина биће додатно дериватизовани употребом [3+2] циклоадиције („клик“ реакцијом) катализоване комплексним једињењима бакра. Реакциони услови биће оптимизовани испитивањем утицаја растварача, базе, температуре, и других услова за извођење реакције. Ток реакција биће праћен танкослојном хроматографијом (TLC). Једињења ће бити пречишћавана хроматографијом на стубу силика-гела (*dry-flash*), препаративном танкослојном хроматографијом, као и кристализацијом. Једињења ће бити окарактерисана применом нуклеарне магнетне резонанције (NMR спектроскопије) користећи једнодимензионалне (^1H и ^{13}C) и дводимензионалне (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) експерименте, као и инфрацрвеном спектроскопијом (IR ATR), масеном спектрометријом високе резолуције (HRMS) и одређивањем температура топљења свих једињења чврстог агрегатног стања. Инхибиторна способност синтетисаних деривата према рекомбинантним Trx1 (тиоредоксин-редуктаза 1) и Trx2 (тиоредоксин-редуктаза 2) одредиће се колориметријски, у ћелијском лизату, помоћу редукције DTNB (5,5'-дисулфандиилбис -(2-нитробензоева киселина)) супстрата до жуто обојеног TNB (2-нитро-5-тиобензоат) продукта, као и инсулинским тестом (тест крајње тачке). Инхибиторна способност добијених једињења према TrxR1 (тиоредоксин-редуктаза 1) одредиће се и директно у живим ћелијама мерењем интензитета флуоресценције након додавања селективне флуоресцентне пробе RX1 (*eng. TrxR1-redox-probe 1*) третираним ћелијама и његовим поређењем са интензитетом флуоресценције нетретираних ћелија. За процену вијабилности A549 ћелија карцинома плућа након третмана добијеним дериватима у различитим концентрацијама, биће употребљен МТТ ((3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-броид)) тест. Биолошки део укључиваће и процену утицаја различитих концентрација новосинтетисаних једињења на вијабилност ћелијских линија неситноћелијског карцинома плућа (сензитивна ћелијска линија са ознаком NCI-H460 и резистентна линија ознаке NCI-H460/R), као и на вијабилност ћелијске линије нормалних плућних фибробласта (ознака MRC-5) како би се утврдила селективност ка туморским ћелијама. Способност формирања про-оксидативне SecTRAP форме TrxR1 биће одређена употребом југлонског есеја.

Део биолошких испитивања биће спроведен на Департману за медицинску биохемију и биофизику Каролинска института у Стокхолму, Шведска. Други део

биолошких испитивања обавиће се у Лабораторији за молекуларну неуро-онкологију Одељења за неуробиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, у Београду.

5. Актуелност проблематике у свету

Тиоредоксин-редуктазе (TrxR) су ензими који имају кључну улогу у одржавању редокс хомеостазе у свим живим ћелијама и заједно са тиоредоксином (Trx) и редукованим никотинамид-аденин-динуклеотидом (NADPH) чине тиоредоксински систем. Примарна биолошка улога TrxR је катализа редукције оксидованог Trx у NADPH-зависној реакцији. [1] Тиоредоксини су мали протеини са дисулфидним мотивом у активном центру који омогућају редукцију ензима рибонуклеотид-редуктазе, пероксиредоксина и метионин-сулфоксид-редуктазе. На тај начин Trx учествује у процесима синтезе ДНК, неутралисању реактивних кисеоничних врста (ROS) и поправке протеина оштећених оксидацијом метионинских остатака до метионин-сулфооксида.[2] Реактивне кисеоничне врсте доминантно се производе у митохондријама и њихов базални ниво, као и флукуације концентрације, неопходни су за редокс-сигналирање, ћелијски раст, диференцијацију, као и за иницијацију путева ћелијске смрти. Међутим, повишен ниво оксидује биомолекуле попут ДНК и липида, што доводи до њиховог оштећења и последично ћелијске смрти. Туморске ћелије у поређењу са нормалним имају повишен ниво ROS. Да би избегле токсичне нивое реактивних кисеоничних врста, туморске ћелије имају повишену активност тиоредоксинског система. [3] Повишени ниво и активност Trx опажа се у многим типовима тумора, укључујући карциноме, леукемије, лимфоме, и повезан је са агресивнијим растом тумора и лошијом прогнозом. Такође, повишени нивои Trx повезани су са резистенцијом тумора на хемиотерапеутике попут цисплатине, доксорубицина, митомицина Ц и др.[4] Стога су савремена истраживања усредсређена на инхибицију антиоксидативне одбране тј. тиоредоксинског система. Тиоредоксин-редуктаза, као главни регулатор тиоредоксинског система, постала је обећавајућа мета у развоју нових антитуморских агенаса. Тренутно не постоји клинички одобрен антитуморски лек који селективно инхибира тиоредоксин-редуктазу, те већина њих (попут ауранофина) показује унакрсну реактивност са глутатионом, што доводи до велике токсичности по здраве ћелије.[5] Једињења са 3-

тропенонским скелетом и пиридинсулфонилним мотивом показују добру селективност према инхибицији цитосолне форме тиоредоксин редуктазе (TrxR1), те њихова дериватизација представља обећавајући приступ за добијање водеће структуре.[6] Триаколи су широко заступљени линкери структурни мотиви у медицинској хемији. Алкилтрифенилфосфонијумски мотиви, као липофилне катјонске групе, често се користе за усмеравање лекова у митохондрије, што може изазвати селективну инхибицију митохондријалне форме тиоредоксин-редуктазе (TrxR2).[7] Неки природни производи који садрже структурни мотив тетраминске киселине попут теназоичне киселине и њених аналога показују антитуморско и цитотоксично дејство.[8]

6. Очекивани резултати

У предложеној дисертацији очекује се синтеза нових деривата 3-тропенона, пиридин-арилсулфоната и тетраминске киселине који су инхибитори тиоредоксин-редуктаза и који показују антитуморску активност у ћелијским линијама карцинома плућа. Очекује се да се хемијским модификацијама постигне виша инхибиторна активност према тиоредоксин-редуктазама у односу на познате деривате. Ако се узме у обзир да је трансформација једињења у трифенилфосфонијум соли широко заступљени начин усмеравања многих лекова у митохондрије, очекује се да ће на овај начин модификовани деривати 3-тропенона селективно инхибирати митохондријалну изоформу тиоредоксин-редуктазе (TrxR2).

7. Литература

- [1] Holmgren, A. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 237- 271
- [2] Lu, J.; Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 66, 75-87
- [3] Arner, E. S.; Holmgren, A. The thioredoxin system in cancer. *Semin. in Cancer Biol.* **2006**, 16, 420–426

- [4] Kłossowski S., et al. Studies toward Novel Peptidomimetic Inhibitors of Thioredoxin–Thioredoxin Reductase System. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 55–67
- [5] Jastrząb, A.; Skrzydlewska E. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* **2021**, 36:1, 362-371
- [6] Stafford, W., et al. Irreversible inhibition of cytosolic thioredoxin reductase 1 as a mechanistic basis for anticancer therapy *Sci. Transl. Med.* **2018**, 10, eaaf7444
- [7] Lu, Z., et al. Synthesis, Biological Evaluation and Action Mechanism Study of New Mitochondria-Targeted Curcumin Derivative as Potential Antitumor Drugs. *Chem. Biodiversity.* **2023**, 20, e202300086
- [8] Wunder, A., et al. Synthesis and anticancer activity of the proposed structure of caldoramide, an N-peptidyltetramate from the cyanobacterium *Caldora penicillate*. *Tetrahedron.* **2018**, 74 5138e5142

Г. Закључак

Предложена тема је научно заснована и актуелна у свету, а очекивани резултати би представљали значајан научни допринос у области медицинске хемије. У складу са Законом о високом образовању и Статутом Универзитета у Београду – Хемијског факултета, а имајући у виду наведено, сматрамо да кандидат испуњава све потребне услове за одобрење израде докторске дисертације, те Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитетау Београду - Хемијског факултета да кандидату Милошу Јовићу, мастер хемичару, одобри израду докторске дисертације под предложеним насловом: „**Синтеза нових N-хетероцикличних инхибитора тиоредоксин-редуктаза као потенцијалних антитуморских агенаса**”. Комисија за менторе предлаже др Игора М. Опсеницу, редовног професора Универзитета у Београду – Хемијског факултета и др Животу Селаковића, доцента Универзитета у Београду – Хемијског факултета.

Списак радова предложених ментора који квалификују менторе за вођење докторске дисертације дат је у Прилогу 1 овог извештаја.

Београд 26.04.2024.

Комисија:

др Игор М. Опсеница, редовни професор,
Универзитета у Београду – Хемијског факултета

др Драгана Милић, редовни професор,
Универзитета у Београду – Хемијског факултета

др Живота Селаковић, доцент,
Универзитета у Београду – Хемијског факултета,

др Ана Подолски-Ренић, виши научни сарадник,
Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Института од националног значаја

др Милица Селаковић, научни сарадник,
Иновационог центара – Хемијског факултета у Београду.

Прилог 1

Списак радова предложених ментора објављених у научним часописима са SCI листе који квалификују менторе за вођење докторске дисертације.

Име и презиме ментора: др Игор М. Опсеница

Звање: Редовни професор

Изабрани радови:

1. Andrija Kokanović, Vladimir Ajdačić, Nataša Terzić Jovanović, Slavica Stankic, and Igor M. Opsenica, Pd Nanoparticles Supported on Ultrapure ZnO Nanopowders as Reusable Multipurpose Catalysts, *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6*, 15820–15828.

<https://doi.org/10.1021/acsnm.3c02743>

2. A. M. Nikolić, J. Stanić, M. Zlatar, M. Gruden, B. Anđelković, Ž. Selaković, V. Ajdačić, I. M. Opsenica, Controlling Pd-catalyzed N-arylation and Dimroth rearrangement in the synthesis of N,1-diaryl-1H-tetrazol-5-amines, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 4794–4803.

<https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00282>

3. A. M. Nikolić, F. Živković, Ž. Selaković, P. Wipf, I. M. Opsenica, One-pot two-step synthesis of isochromene-fused CF₃-substituted pyrazoles, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 5616–5619.

<https://doi.org/10.1002/ejoc.202000942>

4. S. Jeremic, L. Djokic, V. Ajdačić, N. Božinović, V. Pavlovic, D. D. Manojlović, R. Babu, R. Senthamaraikannan, O. Rojas, I. Opsenica, J. Nikodinovic-Runic, Production of bacterial nanocellulose (BNC) and its application as a solid support in transition metal catalysed cross-coupling reactions, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 351–360.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.154>

5. M. Videnović, M. Mojsin, M. Stevanović, I. Opsenica, T. Srdić-Rajić, B. Šolaja, Benzothiazole carbamates and amides as antiproliferative species, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1096–1114.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.067>

Име и презиме ментора: др Живота Селаковић

Звање: Доцент

Изабрани радови:

1. Selaković, Ž.; Nikolić, A. M.; Ajdačić, V.; Opsenica, I. M. Application of Transition Metal-Catalyzed Decarbonylation of Aldehydes in the Total Synthesis of Natural Products. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202101265.

<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ejoc.202101265>

2. Selaković, Ž.; Tran, J. P.; Kota, K. P.; Lazić, M.; Retterer, C.; Besh, R.; Panchal, R. G.; Soloveva, V.; Sean, V. A.; Wells, J. B.; Pavić, A.; Verbić, T.; Vasiljević, B.; Kuehl, K.; Duplantier, A. J.; Bavari, S.; Mudhasani, R.; Šolaja, B. A. Second generation of diazachrysenes: protection of Ebola virus infected mice and mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *162*, 32-50.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418309383>

3. Selaković, Ž.; Soloveva, V.; Gharaibeh, D.; Wells, J.; Šegan, S.; Panchal, R. G., Šolaja, B. A. Anti-Ebola Activity of Diazachrysene Small Molecules. *ACS Inf. Dis.* **2015**, *1*, 264-271.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.5b00028>

4. Videnović, M.; Opsenica, D. M.; Burnett, J. C.; Gomba, L.; Nuss, J. E.; Selaković, Ž.; Konstantinović, J.; Krstić, M.; Šegan, S.; Zlatović, M.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. Second Generation Steroidal 4-Aminoquionolines Are Potent, Dual-Target Inhibitors of the Botulinum Neurotoxin Serotype A Metalloprotease and *P. falciparum* Malaria. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4134-4153.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm500033r>

5. Selaković, Ž.; Opsenica, D.; Eaton, B.; Retterer, C.; Bavari, S.; Burnett, J. C.; Šolaja, B. A.; Panchal, R. G. A Limited Structural Modification Results in a Significantly More Efficacious Diazachrysene-Based Filovirus Inhibitor. *Viruses* **2012**, *4*, 1279-1288.

<http://www.mdpi.com/1999-4915/4/8/1279>