

## **Наставно–научном већу**

### **Универзитета у Београду–Хемијског факултета**

**Предмет:** Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану дисертације **Михајла Ј. Крунића**, мастер хемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета, Универзитета у Београду, одржаној 16. маја 2024. године, изабрани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације (одлука бр. 423/7) кандидата **Михајла Ј. Крунића**, мастер хемичара, студента докторских студија Универзитета у Београду – Хемијског факултета, и истраживача сарадника Универзитета у Београду – Института за хемију, технологију и металургију – Института од националног значаја за Републику Србију, пријављене под насловом:

**„Синтеза, *in vitro* и *in silico* испитивање нових хетероцикличних система као потенцијалних терапеутских инхибитора холинестераза”**

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 24. јуна 2021. године на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број 61206-2553/2-21). Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

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

Докторска дисертација Михајла Ј. Крунића написана је на 114 страна А4 формата (фонт Cambria, величина 12 pt, проред 1, маргине 2 cm) и садржи 183 литературних навода. Текст дисертације садржи 25 схема, 36 слика и 4 табеле. Дисертација се састоји од следећих поглавља: 1. Увод (1 страна), 2. Општи део (23 страна), 3. Наши радови (37 страна), 4. Експериментални део (44 страна), 5. Закључак (2 стране), 6. Литература (7 страна). Поред наведеног, дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са информацијама о менторима и члановима Комисије, Захвалницу, Сажетак на српском језику и енглеском језику, Листу скраћеница (2 стране), Садржај (2 стране), Биографију кандидата (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна),

Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране). Прилог са репродукцијама NMR спектра доступан је посебно, у електронског облику у виду компакт диска.

У **УВОДУ** је дефинисан предмет истраживања дисертације и укратко је описан значај инхибитора холинестераза као терапеутика у лечењу Алцхајмерове болести. Поред тога дат је и кратак преглед садржаја свих поглавља.

У **ОПШТЕМ ДЕЛУ** презентована је детаљна анализа литературних података, подељена у три поглавља која се односе на: Алцхајмерову болест и тренутну терапију, холинергичку хипотезу и фармаколошка испитивања одабраних деривата донепезила и такрина у сврхе лечења Алцхајмерове болести. Поред тога, за неке од презентованих једињења дат је детаљни схематски приказ њиховог добијања.

У поглављу **НАШИ РАДОВИ** приказани су резултати ове дисертације. Детаљно је приказана синтеза 45 нових једињења, подељених у три групе. Прву групу чине 3 деривата тетраhydroхиноксалина који се могу сматрати аналозима донепезила и такрина у ширем смислу, другу групу чини 18 пиперазинских аналога донепезила, а трећу групу чине 24 арилпиперазолских деривата такрина. Дати су и резултати *in vitro* испитивања инхибиторне активности новосинтетисаних једињења према ацетилхолин-естерази и бутирилхолин-естерази. Представљени су и резултати теоријског проучавања изабраних једињења, применом методе молекулског докинга и *in silico* анализе фармакокинетичких параметара.

У **ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ ДЕЛУ** дат је детаљан опис процедура за синтезу нових једињења, као и нумерички подаци релевантних спектра за свако синтетисано једињење у оквиру ове дисертације. Описана је и експериментална процедура *in vitro* експеримената, као и методе коришћене за извођење докинг анализе.

У **ЗАКЉУЧКУ** су сумирани најзначајнији резултати који су проистекли из ове докторске дисертације.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** налази се потпуни списак научних радова и других извора коришћених и цитираних у оквиру ове докторске дисертације, наведених на основу редоследа појављивања у тексту.

## Б. Кратак опис остварених резултата

У оквиру ове дисертације синтетисано је 45 нових једињења која у ширем смислу представљају деривате донепезила, најчешће примењиваног лека у терапији Алцхајмерове болести, и/или такрина, првог комерцијалног лека у терапији Алцхајмерове болести. Новосинтетисана једињења подељена су у три групе. Прва група једињења обухвата 3 нова деривата тетраhydroхиноксалина, који представљају нову класу хетероцикличних система и који се могу сматрати дериватима такрина и донепезила у ширем смислу. Друга група једињења обухвата 18 нових аналога донепезила са *N*-арилпиперидинском и *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>4</sup>-ди-арилпиперазинском фармакофором које су повезане аминским или карбоксамидним линкером. Трећа група једињења обухвата 24 нова деривата такрина добијена повезивањем такринског структурног мотива са различито супституисаним арилпиразолима преко диаминских мостова различитих дужина. Модификоване су и оптимизоване познате синтетичке методе, које укључују *N*-алканоиловање, Hofmann-ово премештање и Buchwald-Hartwig-ово купловање.

Потпуна структурна карактеризација одрађена је за сва новосинтетисана једињења коришћењем следећих спектроскопских метода: 1D и 2D NMR (HSQC), IR и HRMS. Релативна *cis/trans* конфигурација једињења из прве групе одређена је уз помоћ 2D NMR-NOESY експеримената.

Сви лиганди дизајнирани су као потенцијални инхибитори холинестераза, употребом такринског и/или *N*-бензилпиперидинског структурног мотива за које је познато да остварују интеракције са активним местом ензима. Како је познато да A $\beta$  агрегати представљају битну патолошку промену код Алцхајмерове болести, приликом дизајна једињења пажња је фокусирана и на могућност остваривања интеракција и са периферним анјонским местом ацетилхолин-естеразе, који утиче на формирање A $\beta$  агрегата.

Инхибиторна активност свих 45 новосинтетисаних једињења према ацетилхолин-естерази (AChE) и бутирилхолин-естерази (BuChE) одређена је коришћењем Ellman-ове методе. Једињења из прве групе не инхибирају холинестеразе. Лиганди из друге групе (свих 14 деривата) су се показали као селективни инхибитори ацетилхолин-естеразе. Најбољи инхибитори из ове серије су деривати **152** (IC<sub>50</sub> = 2,3  $\mu$ M) и **162** (IC<sub>50</sub> = 4,0  $\mu$ M). Сва једињења из треће групе поседују инхибиторну активност

према оба ензима у микромоларном и наномоларном опсегу концентрација, где је најбољу активност према ацетилхолин-естерази, мало већу од такрина ( $IC_{50} = 0,153 \mu M$ ), имао лиганд **211** ( $IC_{50} = 0,135 \mu M$ ) док је према бутирилхолин-естерази, око два пута нижу активност од такрина ( $IC_{50} = 0,122 \mu M$ ), имао лиганд **210** ( $IC_{50} = 0,052 \mu M$ ). Најбољи однос активности према оба ензима имали су лиганди **211** ( $IC_{50} = 0,135 \mu M$  за AChE и  $0,31 \mu M$  за BuChE) и **215** ( $IC_{50} = 0,33 \mu M$  за AChE и  $0,127 \mu M$  за BuChE).

Докинг анализом лиганада **152** и **162** нађено је да интерагују са каталитичким активним и периферним анјонским местом ацетилхолин-естеразе, остварујући кључне интеракције описане у литератури. Једињење **152** интерагује са активним местом преко *N*-бензилпиперидинског дела молекула, док је код деривата **162** арилпиперазински део молекула одговоран за остваривање интеракције са активним местом ензима. Лиганди **210**, **211** и **215** успостављају кључне интеракције, описане у литератури, са каталитичким активним местом и периферним анјонским местом ацетилхолине-естеразе и каталитичким активним местом бутирилхолин-естеразе. Сва 3 једињења везују се на сличан начин, оријентацијом такринског дела молекула у активно место оба ензима. *In silico* анализа фармакокинетичких параметара свих новосинтетисаних једињења, која поседују инхибиторну активност ка холинестеразама, показала је да испуњавају све услове неопходне да би неко једињење могло надаље бити подвргнуто даљем испитивању као потенцијални терапеутик.

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

Скорији литературни наводи показују да инхибитори холинестераза и даље представљају важан облик терапије Алцхајмерове болести.<sup>1</sup> Од шест лекова одобрених за терапију Алцхајмерове болести, од стране Управе за храну и лекове, три чине инхибитори холинестераза и то: донепезил, ривастигмин и галантамин. Имајући у виду сложену патогенезу саме болести, дизајн нових инхибитора се у скорије време своди на синтезу мултидирекционих лиганада, који би поред побољшане инхибиције холинестераза, деловали и на друге битне биолошке мете у патогенези Алцхајмерове болести.<sup>2</sup> Овај принцип се најчешће заснива на синтези молекулских хибрида, који се састоје из фармакофора за које је познато да остварују интеракције са холинестеразама и/или другим важним биолошким метама у патогенези Алцхајмерове болести.

Поред тога што је најчешће примењиван лек у терапији Алцхајмерове болести, структура донепезила често је коришћена као полазна тачка у синтези мултидирекционих лиганада. Конкретно *N*-бензилпиперидински структурни мотив

овог молекула, за који је показано да има битну улогу у везивању донепезила за активно место ацетилхолин-естеразе, врло често се користи у дизајну аналога у ове сврхе.<sup>3</sup> Пиперазини, познати по својој широкој употреби у разним биолошки активним супстанцама, такође су нашли улогу и у дизајну инхибитора холинестераза.<sup>4</sup> У литератури постоји велики број структурних аналога донепезила развијаних за лечење Алцхајмерове болести, међутим комбинација *N*-бензилпиперидинског и *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>4</sup>-ди-арилпиперазинског структурног мотива није испитивана у терапеутске сврхе Алцхајмерове болести, све до објављеног рада у оквиру ове дисертације.<sup>5</sup>

Такрин, први инхибитор холинестераза искључен из употребе због нежељених дејстава, представља широко коришћен структурни мотив у инхибицији холинестераза. Деривати такрина често не испољавају хепатотоксичност карактеристичну за сам такрин, поред тога сам синтетички приступ за добијање ових деривата није нарочито изазован, стога је развој и синтеза аналога такрина и даље актуелна.<sup>6</sup> Пиразол је структурни мотив присутан у многим комерцијално доступним лековима, као и у лигандима са широким спектром биолошког дејства, укључујући и инхибицију холинестераза.<sup>7</sup> Поред великог броја такринских аналога синтетисаних у сврхе лечења Алцхајмерове болести, деривати који садрже такринско језгро везано за пиразолски прстен нису шире познати. Спајањем ове две фармакофоре добијају се потенцијални мултидирекциони лиганди који би могли истовремено деловати на две или више мета које су укључене у патогенезу Алцхајмерове болести.

Тетрахидрохиноксалин представља структурни мотив присутан у једињењима која имају фармаколошку активност.<sup>8</sup> У ширем смислу се овај хетероциклични, полициклични систем може сматрати модификованим такринским језгром, поседујући бензенов прстен кондензован са пиперазином. Комбинација ове фармакофоре кондензоване са *N*-бензилпиперидином, важном фармакофором донепезила, и синтетски приступ овој класи хетероцикличних једињења до објављивања рада у оквиру дисертације није била позната у литератури.<sup>9</sup>

Свих 45 новосинтетисаних једињења у оквиру ове дисертације од значаја су за органску и медицинску хемију. Једињења прве серије, иако неактивна према холинестеразама, представљају нову класу хетероцикличних једињења која имају могућност дериватизације у различитим фазама синтезе, што потенцијално може имати вишеструку корист у синтези биолошки активних једињења. Једињења из друге серије представљају новосинтетисане аналоге донепезила, који су селективни према инхибицији ацетилхолин-естеразе, слично донепезилу. Присуство арилпиперазинског

структурног мотива потенцијално може имати утицаја и на друге мете као које би биле од значаја у патогенези Алцхајмерове болести. Деривати такрина из треће серије једињења, поред тога што показују добар однос активности према и ацетилхолин-естерази и бутирилхолин-естерази, такође представљају новосинтетисана једињења. Њихова висока активност према и ацетилхолин-естерази и бутирилхолин-естерази и присуство арилпиразолске фармакофоре чини их добрим кандидатима за даља тестирања, као потенцијални терапеутици у сврхе лечења Алцхајмерове болести. Арилпиразолски структурни мотив је од значаја јер испољава широк спектар фармаколошких активности, стога би ова једињења имала потенцијал и за интеракцију са другим биолошким метама од значаја у Алцхајмеровој болести. Докинг анализом је за скоро сва једињења, која остварују инхибиторну активност са ацетилхолин-естеразом, нађено да интерагују са периферним анјонским местом ензима, што их чини потенцијалним инхибиторима стварања неуротоксичних бета амилоидних наслага.<sup>10</sup>

#### Литература:

1. Bouzina A.; Djemel A.; Sekiou O.; Kadi I.; Bouone Y.O.; Mansouri R.; Aouf Z.; Ibrahim-ouali M.; Aouf N.E. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1285*, 135527.
2. Ismaili L.; Refouvelet B.; Benchekroun M.; Brogi S.; Brindisi M.; Gemma S.; Campiani G.; Filipic S.; Agbaba D.; Esteban G.; Unzeta M.; Nikolic K.; Butini S. *Prog. Neurobiol.* **2016**, *151*, 4-34.
3. Sharma P.; Tripathi A.; Tripathi P.N.; Prajapati S.K.; Seth A.; Tripathi M.K.; Srivastava P.; Tiwari V.; Krishnamurthy S.; Shrivastava K. *Eur J. Med. Chem.* **2019**, *167*, 510-524.
4. Więckowska A.; Wichur T.; Godyń J.; Bucki A.; Marcinkowska M.; Siwek A.; Więckowski K.; Zaręba P.; Knez D.; Głuch-Lutwin M.; Kazek G.; Latacz G.; Mika K.; Kołaczkowski M.; Korabecny J.; Soukup O.; Benkova M.; Kieć-Kononowicz K.; Gobec S.; Malawska B. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 1195-1214.
5. Krunić M.J.; Penjišević J.Z.; Suručić R.V.; Šegan S.; Kostić-Rajačić S.V.; Jević I.I. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1276*, 134809.
6. Eckroat T.J.; Manross D.L.; Cowan S.C. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5965.
7. Zia M.; Hameed S.; Nadeem H.; Ali K.A.; Dege N.; Paracha R.Z.; Arshad I.; Naseer M.M. *Bioorg. Chem.* **2022**, *121*, 105658.
8. Chen J.J.; Qian W.; Biswas K.; Viswanadhan V.N.; Askew B.C.; Hitchcock S.; Hungate R.W.; Arik L.; Johnson E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4477-4481.
9. Krunić M.J.; Jevtić I.I.; Penjišević J.Z.; Kostić-Rajačić S.V. *J. Serb. Chem. Soc.* **2021**, *87*, 169-179.

10. Alvarez A.; Opazo C.; Alarcón R.; Garrido J.; Inestrosa N.C. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 348-361.

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

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су два научна рада у међународним часописима са SCI листе и два саопштења: један рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22), један рад објављен у међународном часопису (M23), једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33) и једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34).

#### **Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22)**

1. **Mihajlo J. Krunić.**; Jelena Z. Penjišević.; Relja V. Suručić.; Sandra Šegan.; Slađana V. Kostić-Rajačić.; Ivana I. Jevtić. Structure-activity and binding orientations analysis of potent, newly synthesized, acetylcholinesterase inhibitors, *Journal of Molecular Structure*, **2023**, *1276*, 134809. IF<sub>2022</sub> = 3,8 (Chemistry, Physical 74/161). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134809>

#### **Рад објављен у међународном часопису (M23)**

1. **Mihajlo J. Krunić.**; Ivana I. Jevtić.; Jelena Z. Penjišević.; Slađana V. Kostić-Rajačić. Synthetic route towards 1,2,3,4-tetrahydroquinoxaline/piperidine combined tricyclic ring system, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2022**, *87*, 169-179. IF<sub>2022</sub> = 1,0 (Chemistry, Multidisciplinary 155/178). <https://doi.org/10.2298/JSC210416068K>

#### **Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33)**

1. **Mihajlo J. Krunić.**; Jelena Z. Penjišević.; Slađana Kostić-Rajačić.; Vladimir B. Šukalović.; Deana B. Andrić.; Ivana I. Jevtić. Pyrazole/tacrine derivatives as potential cholinesterase inhibitors. *2nd International Conference on Chemo and Bioinformatics*, September 28-29, **2023**, Kragujevac, Serbia. Book of abstracts p. 567, ISBN 978-86-82172-02-4.

#### **Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)**

1. **Mihajlo Krunić.**; Jelena Penjišević.; Ivana Jevtić.; Milovan Ivanović.; Slađana Kostić-Rajačić. Synthesis and pharmacology evaluation of novel 1-benzyl-N-(4-(4-aryl)piperazin-1-yl)phenyl)piperidin-4-carboxamides, as potential acetylcholinesterase inhibitors. *EFMC-ISMC International Symposium on Medicinal Chemistry*, August 29. – September 02, **2021**, virtual event. Book of Abstracts p. 413.

## Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације проверена је 30.05.2024. године на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду. Помоћу програма *iThenticate*, утврђено је да количина подударања текста износи 21 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена/звања библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, као и подударање текста са претходно публикованим резултатима истраживања проистеклих из дисертације кандидата, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Комисија сматра да је докторска дисертација Михајла Ј. Крунића у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

## Ђ. Закључак

Прегледом докторске дисертације, Комисија је закључила да докторска дисертација под насловом: **„Синтеза, *in vitro* и *in silico* испитивање нових хетероцикличних система као потенцијалних терапеутских инхибитора холинестераза”** кандидата Михајла Ј. Крунића, мастер хемичара представља научно вредан допринос у развоју инхибитора холинестераза, у циљу добијања потенцијалних терапеутика у лечењу Алцхајмерове болести. Комисија је закључила да је кандидат успешно испунио све задате циљеве у оквиру којих је синтетисано и потпуно структурно окарактерисано 45 нових једињења, аналога такрина и/или донепезила. Резултати тестова инхибиторне активности су додатно појашњени и анализирани, како докингом тако и *in silico* анализом фармаколошких параметара на примерима најактивнијих лиганада. Резултати који су проистекли из поднете докторске дисертације су презентовани академској заједници објављивањем у једном раду у истакнутом међународном часопису (М22), једном раду у међународном часопису (М23), једном саопштењу са међународног скупа штампано у целини (М33) и једном саопштењу са међународног скупа штампано у изводу (М34). Треба истаћи значајан допринос резултата ове дисертације и у органској и медицинској хемији, јер поред развијања оптимизованих синтетских путева за добијање лиганада, отвара могућност за развој нових лекова који би могли, или путем њихове дериватизације или могуће интеракције са другим биолошким метама, значајно да утичу на квалитет живота пацијената оболелих од Алцхајмерове болести.



На основу свега наведеног, а у складу са Законом о високом образовању, Статутом Универзитета у Београду – Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Михајла Ј. Крунића под насловом: **„Синтеза, *in vitro* и *in silico* испитивање нових хетероцикличних система као потенцијалних терапеутских инхибитора холинестераза”,** прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора хемијских наука.

У Београду 03.06.2024.

**Комисија:**

---

др Деана Б. Андрић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет

---

др Веселин Р. Маслак, ванредни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет

---

др Јелена З. Пењишевић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију – Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Владимир Б. Шукаловић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију – Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Љиљана Т. Суручић, доцент, Универзитет у Бањој Луци – Медицински факултет