

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET**

Jelena D. Srbljanović

**ISPITIVANJE ANTIMALARIJSKOG POTENCIJALA
NOVOSINTETISANIH AMINOHINOLINA
U in vitro I *in vivo* SISTEMIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY**

Jelena D. Srbljanović

**EVALUATION OF THE ANTIMALARIAL
POTENTIAL OF NOVEL AMINOQUINOLINES
in vitro AND *in vivo***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Marina Milenković,
redovni profesor, **mentor**
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Olgica Đurković-Đaković,
naučni savetnik, **mentor**
Univerzitet u Beogradu - Institut za medicinska istraživanja

Akademik prof. dr Bogdan Šolaja,
redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Datum odbrane:

Doktorska disertacija je u celosti urađena u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u sklopu ove disertacije predstavljaju integralni deo aktivnosti planiranih i sprovedenih u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Kontrola infekcije Apikompleksnim patogenima od novih mesta delovanja leka do predikcije“ (III41019), pod rukovodstvom dr sc. med. Olgice Đurković-Đaković, naučnog savetnika.

*Najmilijima,
Jelici, Dragiši, Ivani i Aleksi*

Izjave zahvalnosti

Zaposlenjem u *Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima* zakoračila sam u čarobni svet nauke u kome je svaki dan novi izazov. Ova doktorska disertacija satkana je od odgovora na brojna pitanja sa kojima sam se svakodnevno suočavala tokom istraživanja. Sazrevanje mene kao naučnice praćeno je raznim nedoumicama, ali sam na sreću okružena ljudima voljnim da mi pomognu.

Neizmerno sam zahvalna mom mentoru, *dr Olgici Đurković-Đaković*, koja je, dajući mi priliku da budem deo njenog izuzetnog tima, omogućila nastavak akademskog usavršavanja. Sa svakim novim zadatkom doprinela je da u profesionalnom smislu napredujem i budem bolja. Neumornim prenošenjem svog znanja i iskustava pomogla mi je da se rezultati mog rada pretoče u ovu disertaciju.

Zahvaljujem se *prof. dr Marini Milenković* koja me je, od trenutka pripreme završnog rada iz farmaceutske mikrobiologije pa sve do odbrane ove disertacije, savetovala i budnim mentorskim okom pratila moj napredak.

Posebnu zahvalnost dugujem *akademiku prof. dr Bogdanu Šolaji* na svim smernicama i sugestijama tokom finalne izrade disertacije, kao i njegovim saradnicima koji su sintetisali hemijska jedinjenja ispitana u okviru ovog istraživanja, *prof. dr Igoru Opsenici*, *dr Nataši Terzić-Jovanović* i *dr Jeleni Konstantinović*.

Veliko hvala *dr Branku Bobiću* koji je učinio da eksperimenti na životinjama budu izvedeni sa lakoćom i da se svakom unapred radujem, *dr Aleksandri Nikolić* na svim korisnim sugestijama i *dr Ivani Klun* na neizmernom strpljenju, pomoći i savetovanju.

Dr Marija Marković je sa mnom nesebično podelila sva svoja znanja i laboratorijske veštine iz oblasti eksperimentalne malarije i osposobila me da ovo opsežno istraživanje izvedem do kraja. Koristim ovu priliku da se i njoj zahvalim.

Posebno se zahvaljujem najdražoj *dr Tijani Štajner*, kako na profesionalnoj pomoći, tako i na iskrenoj i pre svega prijateljskoj podršci koju mi je pružila tokom čitavog perioda izrade ove disertacije. Hvala *Aleksandri Uzelac* na stručnoj pomoći i *Ireni Rajnpreht* koja je imala magičnu moć da napetost pretvori u zvižduk, a laboratorijski rad u pesmu. *Nedi Konstantinović*, *Vladimiru Ćirkoviću* i *Mileni Stopić* zahvaljujem se na novoj energiji koju su uneli u naš tim.

Moji najmiliji su umnogome zaslužni za to što sam danas baš ovakva. Zahvaljujem im se što me bezuslovno vole, podržavaju i veruju u mene nekada više od mene same. Mojoj baki *Jelici* koja svojom blagošću ulepšava svaki moj dan. Tati *Dragiši* i mami *Ivani* koji su svakodnevno podsticali razvoj mojih radnih navika, naučili me da u svaki posao treba uložiti trud, da su preciznost, odgovornost i čvrst karakter od neprocenjive vrednosti, da sve što je započeto mora da se završi i da nema odustajanja čak i kada je teško! Najzad, hvala mom bratu *Aleksi* koji, iako mlađi od mene čitavih devet godina, svojim inteligentnim savetima i računarskim veštinama svaki moj napisani tekst, uključujući i ovaj, i pripremljenu prezentaciju učini posebnijim i boljim. Podrška porodice me je u svakom smislu osnažila da istrajem u izradi doktorske disertacije.

REZIME

Malarija, bolest koja pogađa milione ljudi širom sveta, je parazitska infekcija uzrokovana protozoama roda *Plasmodium*. Danas je poznato pet vrsta koje izazivaju malariju kod čoveka: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* i *P. knowlesi*. Najvirulentnija vrsta je *P. falciparum*, a malariju koju ona izaziva karakterišu najteži klinički tok bolesti kao i najviša stopa smrtnosti. Vektori odgovorni za prenošenje ove bolesti su ženke komaraca roda *Anopheles*. Malarija predstavlja najveći zdravstveni problem sa kojim se suočavaju zemlje u razvoju, a najviše stope morbiditeta i mortaliteta beleže se u zemljama Afrike i Jugoistočne Azije. Međutim, usled klimatskih promena i masovnih migracija stanovništva, autohtoni slučajevi malarije sve češće se pojavljuju sporadično (Korzika, Italija, Španija), pa i epidemijski (Grčka), i u zemljama ili regionima u kojima je ova bolest smatrana eradikovanom. Važno je naglasiti da su prevencija i terapija malarije moguće. Međutim, paraziti *Plasmodium* postaju rezistentni na gotovo sve konvencionalno dostupne antimalarike, anofelični vektori su rezistentni na insekticide, a vakcina i dalje ne postoji. S obzirom na opisanu situaciju, postoji hitna potreba za novim antimalaricima. Sintetski hinolinski derivati najviše obećavaju, među kojima je za hemijske modifikacije najpogodnija struktura 4-aminohinolina.

U cilju proširenja znanja u oblasti hemioterapije malarije ispitana je potencijalna antimalarijska aktivnost 37 novosintetisanih aminohinolina sa hemijskim modifikacijama na aminohinolinskom jezgru i bočnom lancu, sintetisanih na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u *in vitro* i *in vivo* model sistemima.

Ispitivanje antimalarijske aktivnosti ovih jedinjenja u *in vitro* sistemu vršeno je kolorimetrijskim esejom laktat dehidrogenaze (LDH esej). Korišćena su dva soja *P. falciparum*, i to soj 3D7, koji je osetljiv na hlorokvin (CQ) i soj Dd2, koji je rezistentan na CQ. Prvi deo ispitivanja je činila faza skrininga u kojoj je aktivnost svih jedinjenja prema oba soja *P. falciparum* ispitana u koncentraciji od 500 nM, a odabrana jedinjenja su u sledećoj fazi titrirana do preciznih srednjih vrednosti inhibitornih koncentracija (IC₅₀). CQ je korišćen kao pozitivna kontrola.

Antimalarijska aktivnost u *in vivo* sistemu je ispitana primenom modifikovanog Thompson-ovog testa. Ženke miševa soja C57Bl/6 inficirane su ANKA sojem *P. berghei* i praćene 30 dana. Ispitivanju aktivnosti jedinjenja prethodila je faza kliničkog praćenja zdravih životinja tretiranih eksperimentalnim jedinjenjima tokom 3 dana u dozi od 160

mg/kg/dan. Aktivnost netoksičnih jedinjenja ispitana je u dozi od 80 i/ili 160 mg/kg/dan. Kao pozitivna kontrolna grupa korišćeni su miševi tretirani CQ, dok su negativna kontrolna grupa bili netretirani inficirani miševi. Parametri efikasnosti jedinjenja bili su stopa i dužina preživljavanja, kao i parazitemija inficiranih miševa tretiranih jedinjenjima. Parazitemija je praćena mikroskopiranjem razmaza periferne krvi eksperimentalnih miševa (dva puta nedeljno tokom svih 30 dana). U slučaju da mikroskopskim pregledom nije dokazano prisustvo parazita *P. berghei*, rađena je detekcija parazitske DNK kvantitativnom PCR (qPCR) analizom krvi i tkiva jetre. Miševi koji su bili živi na dan 31, sa potvrđenim klirensom parazita, smatrani su izlećenim.

Od 37 jedinjenja ispitanih u fazi *in vitro* skrininga, 22 koja su inhibirala $\geq 50\%$ rast bar jednog od dva soja *P. falciparum* (3D7 i/ili Dd2) odabrana su za dalju titraciju do IC₅₀ vrednosti. Čak 18 jedinjenja se pokazalo aktivnijim od CQ prema soju rezistentnom na CQ (Dd2), dok je među njima samo jedno jedinjenje bilo aktivnije i prema osetljivom soju (3D7). Ovakvi rezultati kvalifikovali su svih 18 jedinjenja za ispitivanje aktivnosti u *in vivo* sistemu, ali tri jedinjenja nisu bila raspoloživa za dalji rad. Međutim, u cilju provere koleracije među rezultatima aktivnosti ispitane u *in vitro* i *in vivo* sistemima, u *in vivo* eksperimente je uključeno i četiri jedinjenja koja nisu bila aktivnija od kontrolnog CQ ni prema jednom od dva ispitivana soja *P. falciparum* (nestandardni pristup), tako da je ukupno 19 jedinjenja ispitano u *in vivo* sistemu. Tri jedinjenja su isključena zbog toksičnosti, a jedno je bilo nedostupno. Aktivnost preostalih 15 jedinjenja je ispitana u *in vivo* sistemu u dozama od 80 i/ili 160 mg/kg/dan. Sva jedinjenja su značajno produžila život inficiranim životinjama u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0.05$). Među njima, sedam jedinjenja je omogućilo preživljavanje 20–100% tretiranih miševa do dana 31, sa ili bez nalaza parazita u perifernoj krvi. Posebno treba istaći tri jedinjenja koja su dovela do izlećenja svih tretiranih životinja, i to CIAQ1 i FCIAQ1 u dozama i od 80 i 160 mg/kg/dan, i CIAQ8 u dozi od 160 mg/kg/dan. Preživljavanje je bilo praćeno i kompletnim klirensom parazita što je dokazano mikroskopskim pregledom razmaza kao i qPCR analizom krvi i tkiva jetre preživelih životinja. Kontinuirano praćenje parazitemije svih tretiranih ispitivanih miševa omogućilo je da se zapazi da su jedinjenja CIAQ4, CIAQ5, CIAQ7, CIAQ9, CIAQ11 i FCIAQ1 omogućila miševima preživljavanje sa izuzetno velikim brojem parazita (59–86%) u razmazu periferne krvi i do kraja eksperimenta, značajno višim od onog s kojim umiru inficirani netretirani miševi.

Čitava serija ispitivanih aminohinolinskih derivata pokazala je izuzetnu antimalarijsku aktivnost. Analizom rezultata uočena je bolja aktivnost velikog broja jedinjenja prema rezistentnom soju *P. falciparum*, što je jedan od osnovnih zahteva za savremene antimalarike. Jezgro 7-hlor-4-aminohinolina pokazalo se kao neophodno za zadržavanje antimalarijskog efekta, dok su se adamantan i benzotiofen istakli kao strukture čije uvođenje u bočni lanac 7-hlor-4-aminohinolina dodatno pospešuje antimalarijsku aktivnost. Fenomen preživljavanja sa veoma visokom parazitemijom ukazao je na uticaj primenjenih jedinjenja na patogenost parazita *P. berghei*. Najzad, treba napomenuti da tri jedinjenja za koja se ispostavilo da su najaktivnija u *in vivo* sistemu nisu imala najbolje *in vitro* rezultate, pri čemu se jedinjenje FC1AQ1 čak pokazalo kao potpuno neaktivno prema rezistentnom soju *P. falciparum*. Ovakav rezultat verovatno ukazuje na to da su za aktivnost odgovorni metaboliti ovih jedinjenja pre nego ona sama. Poslednje navedeno zapažanje je omogućeno pomenutim nestandardnim pristupom odabira jedinjenja za ispitivanje u *in vivo* sistemu, i dozvolilo je da bude uočen efekat koji bi inače bio propušten korišćenjem standardnog pristupa.

Poređenjem antimalarijske aktivnosti nosintetisanih aminohinolina uočeno je da i male strukturne promene u velikoj meri menjaju aktivnost. Rezultati ovog opsežnog istraživanja su od značaja za buduća istraživanja strukturne modifikacije aminohinolina i doprinose proširenju znanja u oblasti hemioterapije malarije.

Ključne reči: malarija, aminohinolini, 3D7, Dd2, *Plasmodium berghei*, LDH esej, Thompson-ov test, adamantan, benzotiofen, parazitemija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska mikrobiologija

UDK broj: 579.91:[57.085:616.936(043.3)]

SUMMARY

Malaria, a disease which affects millions of people worldwide, is a parasitic infection caused by protozoans of the *Plasmodium* genus. Five *Plasmodium* species are known to cause human malaria, including *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*. The most virulent one is *P. falciparum*, and the malaria which it causes is characterized by the most severe clinical presentation as well as the highest mortality rate. The vectors responsible for the transmission of this disease are female mosquitoes of the *Anopheles* genus. Malaria is the greatest health problem facing developing countries, with the highest morbidity and mortality rates in Africa and Southeast Asia. Moreover, due to climate change and mass human migration, autochthonous cases of malaria are increasingly appearing sporadically (Corsica, Italy, Spain) or even as local epidemics (Greece), in countries or regions in which the disease was considered eradicated. It is important to emphasize that the prevention and treatment of malaria are possible. However, *Plasmodium* parasites are developing resistance to nearly all conventional antimalarials, *Anopheles* vectors are becoming resistant to insecticides, and no vaccine exists to date. Given the current situation, there is an urgent need for new antimalarial compounds. Synthetic quinoline derivatives hold the most promise, with 4-aminoquinolines being the most suitable for chemical modifications.

With the aim to expand knowledge in the field of malarial chemotherapy, potential antimalarial activity of 37 novel aminoquinolines with chemical modifications at the aminoquinoline moiety and side chain, synthesized at the University of Belgrade Faculty of Chemistry, were evaluated in both *in vitro* and *in vivo* model systems.

In vitro evaluation of the antimalarial activity of the synthesized compounds was performed using the colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay. Two strains of *P. falciparum* were used, one, 3D7, sensitive to chloroquine (CQ), and one, Dd2, resistant to CQ. Compounds were first screened at a concentration of 500 nM, and selected compounds were then titrated to determine their half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). CQ was used as a positive control.

In vivo antimalarial activity was investigated using a modified *Thompson* test. C57Bl/6 female mice were infected with the ANKA strain of *P. berghei* and monitored for 30 days. Investigation of the antimalarial activity of the experimental compounds was preceded by a series of experiments in which healthy mice treated with the compounds

during 3 consecutive days at a dose of 160 mg/kg/day were clinically monitored; those that showed signs of gross toxicity were excluded from further investigation. The activity of non-toxic compounds was evaluated at a dose of 80 and/or 160 mg/kg/day. Mice treated with CQ were used as a positive control group, whereas untreated infected mice served as a negative control group. Parameters of the efficacy of the examined compounds included the rate of survival, the length of survival, as well as parasitemia. Parasitemia was monitored by microscopic examination of peripheral blood smears (twice a week during all 30 days). In the event that the presence of the parasite *P. berghei* was not detected microscopically, molecular confirmation by quantitative PCR (qPCR) analysis of blood and liver tissue was sought. Mice that were alive on Day 31, with confirmed parasite clearance, were considered cured.

Of the 37 compounds screened at a concentration of 500 nM, the 22 that inhibited growth of at least one of the two *P. falciparum* strains (3D7 and/or Dd2) by $\geq 50\%$ were selected for further titration to the IC_{50} value. As many as 18 compounds were more active than CQ against the CQ-resistant strain (Dd2), whereas only one compound was also more active against the CQ-sensitive strain (3D7). According to these results all 18 compounds qualified for *in vivo* evaluation, but three of them were unavailable. However, four compounds which showed lower activity than CQ against either of the two *P. falciparum* strains were included to check for correlation between activity results obtained *in vitro* and *in vivo* (a non-standard approach). Thus, a total of 19 compounds were investigated in further experiments, of which three compounds had to be excluded due to toxicity and one compound was unavailable. The activity of the remaining 15 compounds was examined *in vivo* at doses of 80 and/or 160 mg/kg/day. The results showed that all 15 significantly prolonged survival of infected animals relative to the control group ($P < 0.05$). Among these, seven compounds afforded the survival of 20–100% of treated mice up to Day 31, with or without the detection of parasites in peripheral blood. Most importantly, three of these, including CIAQ1, FCIAQ1 and CIAQ8, afforded survival of 100% of animals, the first two at 80 and 160 mg/kg/day and the last only at 160 mg/kg/day. Survival was associated with complete parasite clearance, as shown by both microscopy and qPCR. Of note, continuous monitoring of parasitemia allowed the observation of a potentially important phenomenon, that a number of compounds (CIAQ4, CIAQ5, CIAQ7, CIAQ9, CIAQ11, and FCIAQ1) afforded murine survival

despite an extremely high parasite number (59–86%) in peripheral blood smears up to the end of the entire experiment.

The entire series of novel aminoquinolines exhibited exceptional antimalarial activity. A significant number of the examined compounds had increased activity against the resistant *P. falciparum* strain, which is one of the basic requirements for modern antimalarial drugs. The 7-chloro-4-aminoquinoline moiety has proven to be essential for the maintenance of the antimalarial effect, whereas adamantane and benzothiophene stand out as structures whose incorporation into the side chain of 7-chloro-4-aminoquinoline potentiates antimalarial activity. The phenomenon of murine survival of extremely high parasitemia indicates an influence of the applied compounds on the pathogenicity of the *P. berghei* parasite. Finally, it should be noted that the three most active compounds *in vivo* did not have the best *in vitro* results, of which the FClAQ1 compound even exhibited no activity towards the CQ-resistant strain Dd2. These results may indicate that it is the metabolites of these compounds that are responsible for the observed activity rather than the compounds themselves. It is noteworthy that we were able to make this latter observation because of the non-standard approach in the selection of compounds for *in vivo* examination, which allowed us to detect an effect that would have been missed using the standard approach.

By comparing the antimalarial activity of this group of novel compounds, we found that even minor structural modifications substantially affect activity. The results of this extensive study are important, as they may guide future work involving structural modifications of aminoquinolines, and as a contribution to the knowledge in the field of malarial chemotherapy.

Key words: malaria, aminoquinolines, 3D7, Dd2, *Plasmodium berghei*, LDH assay, *Thompson* test, adamantane, benzothiophene, parasitemia

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical microbiology

UDK number: 579.91:[57.085:616.936(043.3)]

SADRŽAJ

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA MALARIJE.....	4
1.2. TRANSMISIJA MALARIJE.....	6
1.3. ŽIVOTNI CIKLUS PARAZITA	7
1.4. KLINIČKA SLIKA MALARIJE.....	9
1.5. DIJAGNOSTIKA MALARIJE.....	10
1.6. TERAPIJA MALARIJE	10
1.6.1. ANTIMALARIJSKI LEKOVI.....	11
1.6.1.1. Hinolinski derivati.....	11
1.6.1.2. Antifolatni antimalarici	13
1.6.1.3. Artemizininski derivati.....	13
1.6.1.4. Ostali agensi	14
1.6.2. DANAŠNJI PRISTUP TERAPIJI I PROFILAKSI MALARIJE	15
1.7. PROBLEMI U TERAPIJI MALARIJE.....	16
1.7.1. REZISTENCIJA NA POSTOJEĆE ANTIMALARIKE.....	16
1.7.2. REZISTENCIJA VEKTORA NA INSEKTICIDE	18
1.7.3. RAZVOJ VAKCINE PROTIV MALARIJE	18
1.8. OTKRIĆE NOVIH ANTIMALARIKA	19
2. CILJ RADA	21
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA	24
3.2. MATERIJAL	25
3.2.1. PARAZITI.....	25
3.2.1.1. Održavanje parazita vrste <i>P. falciparum</i>	25
3.2.1.1.1. Kultivacija <i>P. falciparum</i> u humanim Er	25
3.2.1.1.2. Sinhronizacija <i>P. falciparum</i> u kulturi humanih Er.....	27
3.2.1.1.3. Krioprotekcija kulture iEr	27
3.2.1.2. Održavanje parazita vrste <i>P. berghei</i>	29
3.2.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	29
3.2.3. JEDINJENJA	31
3.3. METODE.....	36
3.3.1. ODREĐIVANJE ANTIMALARIJSKE EFIKASNOSTI JEDINJENJA U <i>in vitro</i> SISTEMU.....	36

3.3.1.1. Izvođenje LDH eseja	36
3.3.1.2. Bojenje LDH eseja	38
3.3.2. ODREĐIVANJE ANTIMALARIJSKE EFIKASNOSTI JEDINJENJA U <i>in vivo</i> SISTEMU	39
3.3.2.1. Kliničko praćenje tretiranih zdravih miševa	39
3.3.2.2. <i>Thompson</i> -ov test	40
3.3.2.3. Molekularna dijagnostika	43
3.3.2.3.1. Ekstrakcija DNK	44
3.3.2.3.2. qPCR	44
3.3.2.4. Parametri efikasnosti jedinjenja u <i>in vivo</i> sistemu	45
3.4. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA	46
4. REZULTATI.....	47
4.1. ANTIMALARIJSKI POTENCIJAL NOVOSINTETISANIH AMINOHINOLINA ISPITAN U <i>in vitro</i> MODEL SISTEMU (LDH ESEJ).....	48
4.1.1. ANTIMALARIJSKA AKTIVNOST JEDINJENJA U <i>in vitro</i> MODEL SISTEMU - SKRINING FAZA	48
4.1.2. ANTIMALARIJSKA AKTIVNOST JEDINJENJA U <i>in vitro</i> MODEL SISTEMU - FAZA ODREĐIVANJA IC ₅₀ VREDNOSTI	51
4.1.3. ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA AKTIVNOSTI JEDINJENJA U <i>in vitro</i> MODEL SISTEMU.....	60
4.2. ANTIMALARIJSKI POTENCIJAL NOVOSINTETISANIH AMINOHINOLINA U <i>in vivo</i> MODEL SISTEMU (<i>Thompson</i> -OV TEST)	63
4.2.1. KLINIČKO PRAĆENJE ZDRAVIH MIŠEVA TRETIRANIH ISPITIVANIM JEDINJENJIMA.....	63
4.2.2. ANTIMALARIJSKA AKTIVNOST JEDINJENJA ISPITANA U <i>in vivo</i> MODEL SISTEMU.....	64
4.2.2.1. Stopa i dužina preživljavanja	64
4.2.2.2. Parazitemija.....	71
4.2.2.2.1. Praćenje parazitemije mikroskopijom krvnih razmaza	72
4.2.2.2.2. Dokazivanje prisustva DNK parazita qPCR metodom	74
4.2.3. ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA AKTIVNOSTI JEDINJENJA U <i>in vivo</i> MODEL SISTEMU.....	76
4.3. UPOREDNA ANALIZA AKTIVNOSTI NOVOSINTETISANIH JEDINJENJA DOBIJENIH ISPITIVANJEM U <i>in vitro</i> I <i>in vivo</i> MODEL SISTEMIMA.....	77
5. DISKUSIJA	79
6. ZAKLJUČCI.....	99
7. LITERATURA	103

1. UVOD

Malarija je infektivna bolest koja nepokolebljivo nastavlja da pretili čovečanstvu odnoseći stotine hiljada ljudskih života godišnje. Smatra se da prva spoznaja o malariji datira još od pre nove ere, a mnoge civilizacije starog veka su ovu drevnu bolest povezivale sa močvarnim tlom ili „otrovnim parama“ od čega i potiče njen naziv: *mal'aria* (*mal* – loš, *aria* – vazduh). Potraga za lekom takođe traje od davnina o čemu svedoče podaci španskih jezuitskih misionara koji su još u XVII veku uočili da lokalno stanovništvo Južne Amerike koristi koru kininovca za lečenje groznice. Uprkos tome što je kinin, prvi lek protiv malarije, otkriven pre nekoliko vekova, do današnjeg dana se traga za jedinjenjem koje će stati na put ovom oboljenju.

Danas je malarija najznačajnija parazitska infekcija na globalnom nivou (White NJ i sar., 2014), o čemu svedoče i podaci Svetske zdravstvene organizacije (SZO) za 2016. godinu kada je prijavljeno 216 miliona slučajeva malarije i 445.000 smrtnih slučajeva (World Health Organization, 2017). Najveći broj slučajeva potiče iz Afrike i jugoistočne Azije, a najugroženija su deca mlađa od pet godina i žene tokom prve trudnoće. U malarijskom području ova bolest je glavni uzrok prevremenog porođaja, male težine deteta na rođenju i smrti deteta i majke, i kao takva nastavlja da bude najveći zdravstveni problem tropskih i suptropskih zemalja (Tuteja, 2007). S druge strane, malarija se sve češće ponovo javlja čak i u nekim zemljama u kojima je do skora bila eradikovana usled progresivnih klimatskih promena i masovnih migracija stanovništva (Tatem i sar., 2017). Takođe, putovanja u i iz zemalja u kojima je ova tropska bolest endemska postaju sve učestalija, tako da je broj slučajeva importovane malarije u neendemskim zemljama u porastu. Posledice su ne samo izazovi u terapiji obolelih pojedinaca već i otvaranje mogućnosti za sekundarni prenos infekcije preko komaraca

roda *Anopheles* koji i dalje postoje u nekim zemljama iz kojih je bolest eradikovana (Andriopoulos i sar., 2013). Naime, prisustvo kompetentnih vektora (komaraca roda *Anopheles*) i rezervoara parazita (ljudi sa gametocitima u krvi koji mogu pri krvnom obroku inficirati vektora) mogu da dovedu do ponovnog pojavljivanja malarije u zemljama u kojima je malarija ranije bile endemska. O tome svedoče slučajevi autohtone *P. vivax* malarije kod ljudi koji nisu imali anamnestički podatak o putovanju u endemske delove sveta, prijavljeni na Korzici (Armengaud i sar., 2008), u Španiji (Santa-Olalla Peralta i sar., 2010) i Italiji (Romi i sar., 2012). Takođe, u Grčkoj, poslednji slučaj autohtone malarije zabeležen je još 1974. godine, od kada su sve do 1991. godine beleženi samo importovani slučajevi (Kampen i sar., 2003). Tada je počelo prijavljivanje sporadičnih slučajeva autohtone malarije, da bi se 2009. godine javila epidemija sa šest slučajeva oboljenja u pokrajini Lakonija (izvor infekcije je bio imigrant iz endemskog područja). Samo dve godine kasnije razvila se epidemija sa čak 20 slučajeva *P. vivax* malarije u više pokrajina (Danis i sar., 2011).

Na osnovu izloženog jasno je da se uzročnik malarije nesmetano kreće širom Zemljine kugle, te tako za ovu bolest ne postoje geografske granice. Parazit je u određenoj meri rezistentan na gotovo sve danas dostupne antimalarike, komarci (vektori) postaju rezistentni na insekticide, a vakcine još uvek nema. U ovako delikatnoj situaciji celom svetu je u interesu kako da se unapredi terapija malarije tako i da se pronade način koji će omogućiti njenu eradikaciju (Feachem i sar., 2010).

1.1. EPIDEMIOLOGIJA MALARIJE

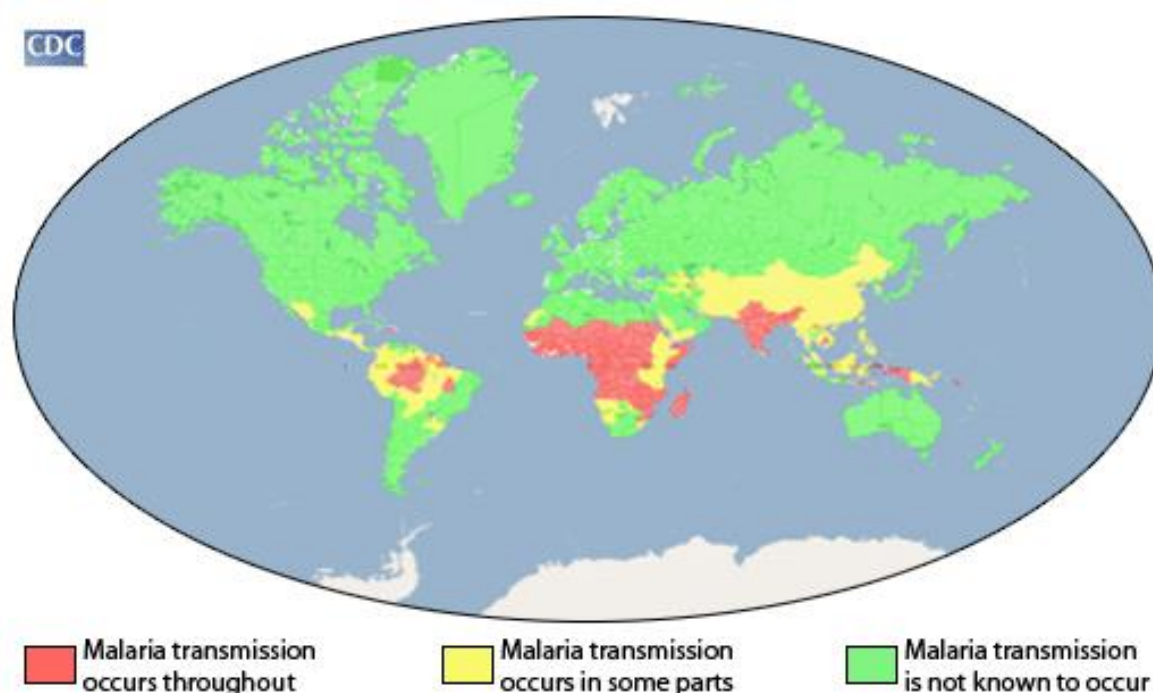
Phylum: Apicomplexa
Classis: Haemosporidea
Ordo: Haemosporida
Familia: Plasmodiidae
Genus: *Plasmodium*

Charles Louis Alphonse Laveran je 1880. godine u krvi malaričnog bolesnika otkrio njenog uzročnika, parazit roda *Plasmodium* (Laveran, 1881), dok je Ronald Ross 1898. godine opisao razvojne stadijume parazita u komarcu. Obligatno intracelularni paraziti ovog roda svrstavaju se u devet podrodova, od kojih su tri zastupljena u sisarima, četiri u pticama i dva u gušterima. Danas je poznato pet vrsta ovog roda koje izazivaju malariju kod čoveka: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* i *P. knowlesi*. Njihovo otkriće teklo je postepeno. U XIX veku okarakterisane su tri vrste: *Haemamoeba vivax*, *Laverania malariae* i *Haemamoeba malariae*, koje danas odgovaraju vrstama *P. vivax*, *P. falciparum* i *P. malariae*. Početkom XX veka John Stephens je u zapadnoj Africi otkrio vrstu koja liči na *P. vivax* malariju i tada je *P. ovale* opisana kao četvrta vrsta koja uzrokuje malariju kod ljudi (Stephens, 1922). *P. knowlesi* je zoonotska vrsta, prvi put opisana 1931. godine kod dugorepih majmuna u Singapuru (Coatney i sar., 1971). Međutim, iako su prvi slučajevi humane *P. knowlesi* infekcije zabeleženi u dva navrata, oba u Maleziji još davne 1965. i 1971. godine, tek kada su 2004. godine Singh i sar. opisali 120 slučajeva prirodno stečene infekcije kod ljudi u oblasti jugoistočne Azije, ova vrsta je prepoznata kao peti uzročnik malarije kod ljudi (Singh B i sar., 2004; White NJ, 2008).

P. falciparum je rasprostranjen u tropskim i suptropskim oblastima širom sveta, i predstavlja dominantnu vrstu na afričkom kontinentu. *P. vivax* se najčešće nalazi u Aziji, Latinskoj Americi i nekim delovima Afrike, a ono što ovu vrstu razlikuje od *P. falciparum* jeste zastupljenost i u umerenim klimatskim područjima. *P. ovale* je rasprostranjen u zemljama podsaharske Afrike, jugoistočne Azije i Indijskog podkontinenta. Distribucija *P. malariae* se u potpunosti poklapa sa distribucijom *P. falciparum* (podsaharska Afrika,

jugoistočna Azija, zapadni Pacifik, Južna Amerika i u nedavnoj prošlosti Evropa i južni delovi SAD-a) (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). *P. knowlesi* je značajan uzročnik malarije u jugoistočnoj Aziji, i čak je najčešća prijavljena vrsta koja uzrokuje malariju u Maleziji (Kantele i Jokiranta, 2011), ali za sada ne i u drugim delovima sveta (Slika 1).

Najveći broj slučajeva malarije u 2016. godini zabeležen je u Africi, čak 90%. U regionu jugoistočne Azije zabeleženo je 7%, a u istočnom Mediteranu 2% slučajeva. Najčešći uzročnik malarije u podsaharskoj Africi sa čak 99% slučajeva je *P. falciparum*. U regionu Amerike najdominantnija vrsta bila je *P. vivax* kao uzročnik 64% slučajeva malarije. Ova vrsta je bila uzročnik preko 30% slučajeva malarije u jugoistočnoj Aziji i čak 40% slučajeva u regionima istočnog Mediterana (World Health Organization, 2017).



Slika 1. Distribucija malarije u svetu
(preuzeto sa <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>)

Na teritoriji bivše Jugoslavije slučajevi malarije nisu zabeleženi od 1964. godine, te je SZO proglasila eradikaciju malarije 1974. godine. U Srbiji se od eradikacije beleže samo slučajevi importovane malarije, ali se smatra da rizik za ponovnim uspostavljanjem postoji (Dakić i sar., 2008) jer je pre eradikacije na području naše zemlje bilo anofeličnih vektora. Naime, područja u priobalju Save i Dunava su pogodna za održavanje komaraca *Anopheles* spp., pa su proglašena prijemčivim za malariju. Iako na našem tlu autohtone malarije nema već decenijama, kako se broj građana Srbije koji putuju u tropske zemlje od 2000. godine polako ali stalno uvećava (Dakić i sar., 2011), uvećava se i broj importovanih slučajeva, a pojedini predstavljaju i dijagnostički i terapijski problem (Poluga i sar., 2016). Ako na to pridodamo globalno zagrevanje, sociopolitičke (migracije izazvane konfliktima) i ekološke faktore jasno je da postoji mogućnost pojave sporadičnih autohtonih slučajeva i u našoj zemlji. Dakle, neophodna je stalna spremnost zdravstvenog sistema kako za dijagnostiku tako i za terapiju ovog oboljenja.

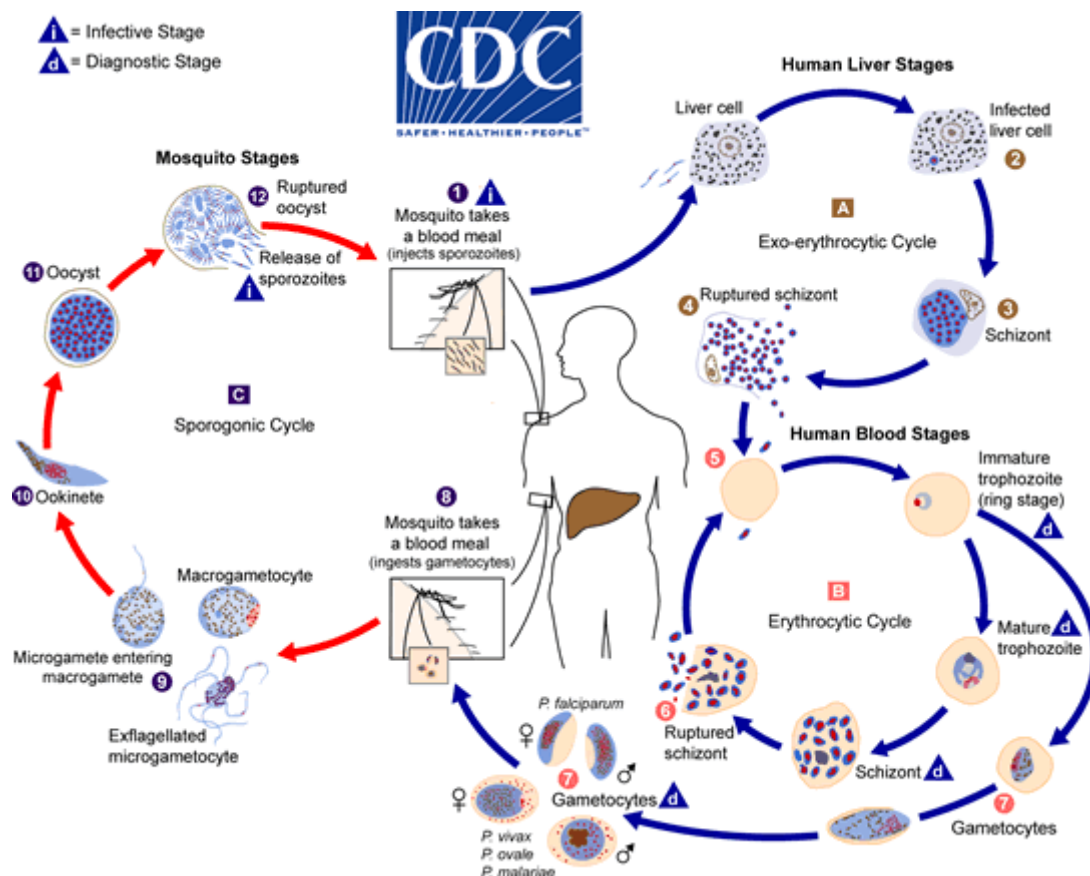
1.2. TRANSMISIJA MALARIJE

Plasmodium paraziti se na čoveka prenose ubodom inficiranog komarca roda *Anopheles* (tokom krvnog obroka), i to samo ženki (Grassi, 1900). Od 400 vrsta roda *Anopheles* oko 30 je odgovorno za prenošenje malarije. Krvnim obrokom se obezbeđuju nutritivni sastojci za razvoj jaja koja ženka polaže u vodi, zatim prelaze u larve, pa u odraslu jedinku. Kompletiranje životnog ciklusa u vektoru zavisi od temperature, vlažnosti vazduha i životnog veka jedinke. Rast parazita ubrzavaju visoke temperature, a najpogodniji klimatski uslovi su sezone kiša.

Uzročnici malarije mogu da se prenesu i transfuzijom krvi, zajedničkim kontaminiranim iglama ili transplacentno (Redd i sar., 1996).

1.3. ŽIVOTNI CIKLUS PARAZITA

Životni ciklus parazita *Plasmodium* odvija se u stalnom domaćinu, ženki komarca roda *Anopheles* (seksualna faza razvoja, sporogonija), i prelaznom domaćinu, čoveku (aseksualna faza razvoja, šizogonija). Sporogonija se odvija u želucu komarca pri čemu nastaju sporozoiti koji su infektivni za čoveka a skladište se u pljuvačnim žlezdama. Humana infekcija nastaje ako zaražen komarac tokom krvnog obroka ubodom unese sporozoite u krvotok čoveka čime počinje šizogonija. Šizogonija se sastoji od preeritrocitne ili egzoeritrocitne (EE) i eritrocitne (E) faze. EE faza započinje kada sporozoiti uđu u ćelije parenhima jetre (hepatocite) a klinički odgovara periodu inkubacije. Replikacijom sporozoita nastaju hiljade novih merozoita koji nakon rupture hepatocita prodiru u cirkulaciju i napadaju eritrocite (Er). Prodorom parazita u Er započinje E faza koja se poklapa sa pojavom simptoma bolesti i zavisno od vrste traje od 24 do 72 h. Merozoit u Er raste a jedro se potiskuje ka periferiji (stadijum prstena). Posle nekoliko sati prodire u stromu Er i u parazitu se pojavljuje hemozoin, malarični pigment nastao digestijom hemoglobina (Hb). Sve ove faze obuhvataju visoko metabolički aktivan stadijum trofozoita. Jedro se sada usitnjava do strukture šizonta, od kojih nastaje nova generacija merozoita koji, kada sazru, dovode do prskanja Er, prodiru u krvotok i napadaju nove Er. Broj napadnutih Er se povećava sa svakom novom generacijom merozoita. Razvoj gametocita počinje posle nekoliko E ciklusa kada neki merozoiti ne prelaze u stadijum prstena, već od njih nastaju mladi gametociti kod kojih se jedro diferencira ili tako što se hromatin zadrži u sredini i formira rastresito jedro, čime nastaje mikrogametocit (♂), ili nastaje kompaktno jedro smešteno periferno čime nastaje makrogametocit (♀). Dalji razvoj i sazrevanje gametocita moguć je jedino ako ih preuzme novi komarac tokom krvnog obroka. U želucu komarca dolazi do oplodjenja mikro- sa makrogametocitom čime nastaje zigot koji prolazi kroz mejozu i diferencira se u pokretnu invazivnu ookinetu. Ookineta je učaurena u zidu želuca u obliku ciste. Procesom sporogonije, u oocisti se formiraju stotine sporozoita, koji nakon prskanja ciste prelaze u limfu putem koje dolaze do pljuvačnih žlezdi komarca gde se akumuliraju i čekaju da pređu u novog prelaznog domaćina tokom sledećeg krvnog obroka (Slika 2).



Slika 2. Životni ciklus *Plasmodium* parazita (preuzeto sa <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>)

Za vrste *P. vivax* i *P. ovale* karakteristično je da se paralelno sa E fazom odvija i sekundarna EE faza u jetri, koja može da se održava i nakon iščezavanja parazita iz periferne krvi. Naime, jedan deo sporozoita primarne EE faze može da se „uspava“ u jetri (hipnozoiti), i da dovede do ponovne infekcije Er odn. nove epizode bolesti (relapsa), te malarija može da se manifestuje mesecima ili godinama nakon što je osoba napustila malarično područje (Gladwin i sar., 2014). Relaps treba razlikovati od rekrudescencije, koja predstavlja posledicu submikroskopske parazitacije i usporene šizogonije koja rezultira zakasnelim (čak i do 40 godina) oslobađanjem merozoita i potonjim (nakon tog latentnog perioda) nastavkom E faze ciklusa, uz pojavu prateće kliničke simptomatologije. Pojava rekrudescencije karakteristična je za malariju izazvanu *P. malariae*, posebno kod nelečenih ili nedovoljno dugo lečenih bolesnika.

1.4. KLINIČKA SLIKA MALARIJE

Malarija je multisistemsko oboljenje koje karakterišu febrilno stanje praćeno nespecifičnim simptomima kao što su glavobolja, mućnina, povraćanje, bol u mišićima i malarićni napad, skup paroksizama sa afebrilnim intervalima koji zavisno od vrste uzročnika traje 24 h (*P. knowlesi*), 36-48 h (*P. falciparum*), 48 h (*P. vivax*, *P. ovale*) ili 72 h (*P. malariae*). U slučaju napredovanja bolesti javljaju se splenomegalija i manje izražena hepatomegalija. U krvi se može otkriti normocitna anemija različite težine. Može da se izleći primenom adekvatnih lekova, međutim, ako se infekcija ne kontroliše (nelećeni ili delimićno lećeni pacijenti), bolest može da napreduje, čak je moguć i smrtni ishod usled komplikacija (Cowman i sar., 2016).

Ozbilnost klinićeke slike zavisi od vrste uzročnika. Malarija koju izaziva *P. falciparum* je klinićeke najteži oblik bolesti praćen visokom parazitemijom. Ova vrsta napada Er svih starosti (Brooks i sar., 2013); citoadhezijom i sekvestracijom parazitiranih Er u mikrovaskulaturi nastaje opstrukcija dotoka krvi u vitalne organe, zbog čega ove infekcije mogu dovesti do teških i često fatalnih komplikacija (cerebralna malarija, oštećenje bubrega, plućni edem, tropska splenomegalija, crnomokraćna groznica, dizenterićna malarija, hladna malarija, hipoglikemija...). Malarija uzrokovana *P. falciparum* je posebno opasna za trudnice jer može da dovede do teške anemije trudnice kao i do ozbiljnih komplikacija u trudnoći kao što su intrauterusna retardacija rasta ploda, prevremeni porođaj pa i neonatalna smrt, jer se zaraženi Er sekvestriraju i akumuliraju u posteljici. Malarija izazvana vrstom *P. vivax* može se manifestovati visokom parazitemijom, ali je retko fatalna. Vrste *P. malariae* i *P. ovale* izazivaju znatno manji broj klinićeke slučajeva malarije i karakteriše ih znatno niža parazitemija u odnosu na prethodno pomenute vrste. Međutim za vrste *P. vivax* i *P. ovale* recidivi infekcije su karakteristićni zbog prisustva hipnozoita u jetri, dok *P. malariae* može dovesti do nefrotskog sindroma kod dece, sa najvećom učestalošću do 5. godine života. Pošto je aseksualni ciklus umnožavanja za vrstu *P. knowlesi* najkraći – traje svega 24h – i ova vrsta može izazvati klinićeke težak oblik bolesti, koji po simptomatologiji najviše podseća na malariju koju izaziva *P. falciparum*. Brzo može doći do visoke parazitemije, teške bolesti pa i smrti (Millar i Cox-Singh, 2015).

1.5. DIJAGNOSTIKA MALARIJE

Dijagnostika malarije obuhvata mikroskopske metode (pregled guste kapi i krvnog razmaza), brze dijagnostičke testove, serologiju i metode molekularne dijagnostike. Mikroskopija godinama predstavlja zlatni standard u konvencionalnoj dijagnostici malarije (Makler i sar., 1998; Moody, 2002). Karakteriše je niska cena (Jonkman i sar., 1995), a samim tim ekonomska dostupnost i za slabo razvijene zemlje, ali zahteva obučenog mikroskopistu (koji nije svugde na raspolaganju) i rezultat je subjektivan, a posebno nesiguran ako se radi o niskim parazitacijama a takođe su moguće i greške na nivou identifikacije vrste (Payne D, 1988; Morassin i sar., 2002; Mangold i sar., 2005). Danas se navedeni nedostaci mikroskopije prevazilaze dopunskom upotrebom qPCR-a, molekularne metode sa vrlo visokom specifičnošću i senzitivnošću. Jedno istraživanje na kliničkim uzorcima obolelih od malarije lečenih u Srbiji u periodu od 2010. do 2013. pokazalo je prednosti qPCR u odnosu na konvencionalne metode kod diferencijalne dijagnoze vrste *P. ovale* kako prema *P. vivax* tako i prema *P. malariae*, kao i za monitoring efekta terapije (Dakić i sar., 2014). Takođe, zbog međusobne morfološke sličnosti preporučena je upotreba metoda molekularne dijagnostike i za diferencijalnu dijagnozu vrsta *P. knowlesi* i *P. malariae* (Singh B i sar., 2004).

1.6. TERAPIJA MALARIJE

Malarija je bolest koja može da se prevenira i leči.

Preventivne mere u endemskim područjima uključuju tretiranje komaraca insekticidima, upotrebu mreža protiv komaraca tretiranih insekticidom i profilaktički antimalarijski tretman trudnica u područjima visokog rizika.

Lečenje malarije zasniva se na hitnom kliničkom pregledu obolelog, preciznom određivanju vrste *Plasmodium* uzročnika i pravovremenoj upotrebi preporučene terapije. Ispravna i brza dijagnoza posebno *P. falciparum* malarije je imperativ i može biti presudna za spašavanje života.

1.6.1. ANTIMALARIJSKI LEKOVI

Više vrsta lekova iz različitih klasa su u primeni, koji deluju na jedan ili više životnih oblika plazmodijuma. U odnosu na razvojni stadijum parazita prema kome ispoljavaju svoju aktivnost antimalarici se dele na krvne i tkivne šizontocide, gametocide i sporontocide. Krvni šizontocidi deluju na aseksualne oblike u krvi čoveka i sprečavaju pojavu malaričnih napada. Meta tkivnih šizontocida su hipnozoiti u jetri čijim dejstvom se sprečava pojava relapsa. Gametocidi smanjuju transmisiju malarije jer deluju na gametocite koji su infektivni za komarce, dok sporontocidi sprečavaju sazrevanje gametocita i stvaranje sporozoita u komarcu. U daljem tekstu antimalarici će biti pojedinačno opisani prema vrsti hemijske strukture.

1.6.1.1. Hinolinski derivati

Kinin je glavni predstavnik hinolinskih antimalarika. Predstavlja prvi lek protiv malarije u širokoj upotrebi i strukturu od koje su potekli svi ostali derivati ove najbrojnije klase antimalarika. Ovaj alkaloid je ekstrahovan iz kore kininovog drveta (*Cinchona succiubra*) 1820. godine, a u terapijskoj primeni je od 1890. godine. Deluje kao krvni šizontocid (Meshnick, 1997). Za razumevanje mehanizma dejstva kako kinina, tako i ostalih hinolinskih derivata, neophodno je poznavati metabolizam parazita malarije. Naime, parazit u E fazi razvoja vrši degradaciju 75% Hb domaćina i na taj način sebi obezbeđuje aminokiseline neophodne za rast i razvoj (Goldberg i sar., 1990). U hranljivoj vakuoli (HV) peptidaze razlažu Hb do gvožđe (II) protoporfirina IX (hema) i globina. Hem se brzo oksiduje u gvožđe (III) protoporfirin IX (hematin) koji je toksičan za parazit i nakuplja se u HV (Francis i sar., 1997; Dorn i sar., 1998). Da ne bi došlo do prekida rasta i proliferacije parazita neophodna je detoksikacija hematina do hemozoina, malaričnog pigmenta netoksičnog za parazit (Jani i sar., 2008). Hinolini se akumuliraju u parazitskoj HV a njihov mehanizam dejstva zasnovan je na inhibiciji prevođenja hematina u hemozoin (Schlesinger i sar., 1988). Kinin je dugo bio lek prvog izbora u terapiji *P. falciparum* malarije rezistentne na hlorokvin (CQ), ali je danas zamenjen brzodelujućim derivatima artemizininima. Primenuje se oralno, a kod teških oblika *P. falciparum* malarije u sporu intravenskoj (i.v.) infuziji. Ima malu terapijsku širinu i značajna neželjena dejstva. U terapijskim koncentracijama neželjena dejstva su blaga i

uključuju zujanje u ušima, blago oštećenje sluha, glavobolju i mučninu. Oštećenje sluha je obično dozno zavisno i reverzibilno. Ozbiljnije manifestacije uključuju vrtoglavicu, povraćanje, bol u stomaku, dijareju, gubitak sluha i vida. Još jedno značajno neželjeno dejstvo terapije kininom je hipoglikemija, koja predstavlja poseban problem kod trudnica. Manje česta ali ozbiljnija neželjena dejstva su hipotenzija (ako se lek daje previše brzo), venska tromboza (nakon i.v. injekcija), srčane aritmije i poremećaj funkcije CNS-a (u najtežim slučajevima delirijum i koma) (Achan i sar., 2011). Stereoizomer kinina je kinidin koji se takođe koristi u terapiji.

Struktura kinina je poslužila kao osnova za razvoj njegovih sintetskih derivata CQ, meflokvina (MQ), primakvina (PQ) i halofantrina (Stocks i sar., 2001).

Krvni šizontocid CQ je najšire korišćeni 4-aminohinolin, uveden u terapiju 1945. godine kao efikasan i jeftin lek, bezbedan za primenu i kod trudnica. Kao slaba dvoprotonska baza difuzijom se skladišti u kiseloj mikrosredini HV parazita i postepeno zadržava protonovanjem. Selektivnim nakupljanjem u HV parazita, CQ deluje na eritrocitne forme parazita svih vrsta *Plasmodium* spp. sprečavanjem polimerizacije toksičnog hematina čijim nakupljanjem dolazi do smrti parazita (Chou i sar., 1980). Danas je njegova upotreba ograničena zbog širenja rezistencije. Lek ispoljava mali broj neželjenih dejstava kada se primenjuje u profilaktičkoj dozi, dok se sa povećanjem doze (npr. kod lečenja malaričnih napada) mogu javiti gastrointestinalne smetnje i urtikarija, dok veoma visoke doze mogu da izazovu fatalne aritmije.

Amodiakvin (AQ) je 4-aminohinolin koji deluje slično CQ. Postoji delimična ukrštena rezistencija ova dva leka. AQ se trenutno koristi u kombinaciji sa artesunatom.

MQ je 4-metanolohinolin uveden u terapiju 1980. godine kao vrlo efikasan lek u terapiji *P. falciparum* malarije rezistentne na CQ, ali se rezistencija i na monoterapiju ovim lekom razvila samo nekoliko godina po uvođenju. Uprkos tome, MQ se trenutno uspešno koristi u kombinaciji sa artesunatom (Denis i sar., 2006a). Neželjena dejstva su gastrointestinalne tegobe, prolazne smetnje u funkciji CNS-a i poremećaji srčanog ritma.

PQ je 8-aminohinolin koji deluje kao tkivni šizontocid i gametocid (Bunnag i sar., 1980). Predstavlja antirelapsni lek izbora jer je efikasan u eliminaciji hipnozoita iz jetre (*P. vivax* i *P. ovale*). Koristi se i u profilaktičke svrhe jer deluje na gametocite *P.*

falciparum. Primjenjuje se u kombinaciji sa CQ i drugim antimalaricima. U terapijskim dozama retko izaziva neželjena dejstva, i to u vidu gastrointestinalnih smetnji.

1.6.1.2. Antifolatni antimalarici

Antifolatni antimalarici su kompetitivni inhibitori folne kiseline koji efekat ostvaruju zaustavljanjem njene biosinteze (Warhurst, 1986) inhibicijom parazitskih enzima, i to dihidropteroat sintaze kompeticijom sa p-aminobenzoevom kiselinom (sulfonamidi - sulfadoksin i sulfoni - dapson) ili dihidrofolat reduktaze koja konvertuje dihidrofolat u tetrahidrofolat (pirimetamin i progvanil). Kombinacija lekova iz ove dve grupe deluje sinergistički jer blokiraju isti biohemijski proces na različitim mestima. Otuda se pirimetamin primjenjuje isključivo u kombinaciji sa sulfonima ili sulfonamidima. Kombinacija sulfadoksina i pirimetamina (SP, Fansidar[®]) se koristila za lečenje CQ rezistentnih malarija, ali je danas upotreba ove kombinacije u terapiji malarije ograničena razvojem rezistencije (Das i sar., 2013). Kombinacija je još uvek efikasna u profilaksi. U terapijskim dozama ovaj lek ispoljava blaga neželjena dejstva u vidu gastrointestinalnih tegoba i osipa na koži. U retkim slučajevima može doći do teških formi kožnih alergijskih reakcija, hemolitičke anemije i agranulocitoze.

1.6.1.3. Artemizininski derivati

Suvo lišće biljke *Artemisia annua* (*A. annua*) u Kini je korišćeno za lečenje groznice tokom više od dva milenijuma. Aktivno jedinjenje artemizinin (ART) je izolovano 1970-ih godina i što je nama posebno zanimljivo po prvi put u Beogradu (Vajs i sar., 2017), a deset godina kasnije se artemizininski derivati uvode u terapiju malarije. Antimalarijska aktivnost potiče od prisustva peroksidnog mosta ali mehanizam delovanja nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da prilikom interakcije peroksidnog mosta i gvožđa koje se nalazi u hemu nastaju kiseonični radikali. Oni se vezuju za membranske proteine, uzrokuju lipidnu peroksidaciju, inhibiraju Ca⁺-ATPazu endoplazmatskog retikuluma, zaustavljaju sintezu proteina i dovode do lize parazita (Eckstein-Ludwig i sar., 2003). Deluju kao krvni šizontocidi (ter Kuile i sar., 1993) i gametocidi (Pukrittayakamee i sar., 2004) brzog dejstva i dugog poluvremena eliminacije. ART je efikasan u terapiji teških, multirezistentnih i cerebralnih oblika *P. falciparum* malarije

(Waknine-Grinberg i sar., 2010). Polusintetski derivati su sintetisani u cilju poboljšanja bioraspoloživosti usled oralne primene. Trenutno se u terapiji koriste artemetar, artesunat i dihidroartemizinin. Neželjena dejstva su retka i manifestuju se febrilnim epizodama i smanjenjem broja neutrofilnih leukocita u krvi.

Koncept kombinovane terapije zasnovane na artemizininu (eng. *Artemisinin-based combination therapy, ACT*) prvi put je predstavljen 1990-ih godina u Aziji kao odgovor na rezistenciju parazita na široko dostupne antimalarike koji se koriste kao monoterapija (O'Neill i sar., 2010). Kombinaciju čine polusintetski kratkododelujući derivat artemizininina i dugododelujući antimalarik druge grupe, a glavna prednost je njihovo sinergističko dejstvo. Naime, artemizininiski derivat brzo uklanja većinu parazita (približno 10^8 u roku od tri dana) dok drugom agensu preostaje relativno mali broj parazita za uklanjanje (Travassos i Laufer, 2009). Na ovaj način se značajno smanjuje populacija parazita izložena dugododeljućem antimalariku, čime se smanjuje i rizik od mutacija koje su uzrok rezistencije. ACT je sada preporučena kao prva linija terapije za *P. falciparum* malariju u svim endemskim zemljama. SZO preporučuje sledeće kombinacije: artemetar-lumefantrin (Coartem[®]), artesunat-amodiakvin, artesunat-meflokvin, artesunat-SP, dihidroartemizinin-piperakvin.

1.6.1.4. Ostali agensi

Atovakvon je sintetski antimalarik koji se koristi za lečenje nekomplikovanih oblika *P. falciparum* infekcije i u profilaksi malarije (Marra i sar., 2003). Zaustavlja sintezu pirimidina inhibicijom mitohondrijalnog lanca transporta elektrona. Rezistencija na monoterapiju atovakvom se brzo razvija, tako da se često kombinuje sa progvanilom sa kojim deluje sinergistički (Malarone[®]). Ova kombinacija je veoma efikasna, dobro se podnosi i na nju se znatno ređe razvija rezistencija. Primenjuje se i u kombinaciji sa tetraciklinima.

Halofantrin je krvni šizontocid nerazjašnjenog mehanizma delovanja (de Villiers i sar., 2008). Koristi se kao rezervni lek u terapiji malarije izazvane rezistentnim sojevima jer pored gastrointestinalnih smetnji može da izazove i ozbiljna neželjena dejstva (iznenadna srčana smrt).

Lumefantrin je strukturno sličan kininu, MQ i halofantrinu. Nikada nije korišćen kao monoterapija tako da u smislu razvoja rezistencije njegova kombinacija sa artemetrom (Coartem[®]) ima prednost u odnosu na ostale kombinacije (Adjei i sar., 2009).

Antimalarijski efekat ispoljava i nekoliko antibiotika koji inhibiraju sintezu proteina selektivno delujući na nivou 70 S ribozoma parazita kao što su tetraciklin, doksiciklin, klindamicin, azitromicin (Divo i sar., 1985). Najčešće se koriste u kombinaciji sa kininom.

1.6.2. DANAŠNJI PRISTUP TERAPIJI I PROFILAKSI MALARIJE

ACT je terapija prvog izbora za nekomplikovane slučajeve malarije uzrokovane vrstom *P. falciparum* ili čiji uzročnik nije utvrđen. Terapija izbora komplikovanih slučajeva malarije je i.v. ili intramuskularna (i.m.) aplikacija artesunata, dok je druga linija i.m. artemetar (World Health Organization, 2015). CQ je ostao lek prvog izbora za terapiju nekomplikovanih slučajeva *P. vivax* infekcija u endemskim zemljama, dok u cilju sprečavanja relapsa u većini slučajeva treba uključiti i PQ. Osim navedenog antirelapsnog efekta, PQ poboljšava CQ aktivnost prema *P. vivax* CQ-rezistentnim sojevima koji su počeli da se pojavljuju (Price i sar., 2014). U slučaju visokog stepena neuspelog tretmana sa CQ (> 10%), preporuka je da terapija prvog reda za malariju koju uzrokuje *P. vivax* takođe bude ACT (World Health Organization, 2017) i to kombinacije artemetar-lumefantrin, artesunat-amodiakvin i dihidroartemizinin-piperakvin (Leang i sar., 2013). Režim lečenja *P. ovale* infekcije sličan je kao za *P. vivax* infekciju, uključujući i upotrebu PQ da bi se sprečio relaps iz hipnozoita. Prilikom terapije pacijenata inficiranih vrstom *P. malariae* posebno treba sprečiti rekrudescenciju, a terapija je slična prethodno navedenoj za *P. vivax* i *P. ovale* infekcije. Infekciju parazitom *P. knowlesi* treba tretirati kao *P. falciparum* malariju (Barber i sar., 2017) zbog potencijalno teške kliničke slike usled brzog razvoja (24 h) visoke parazitemije, naročito u situacijama kada se ne može isključiti koinfekcija sa *P. falciparum*. Čini se da je *P. knowlesi* infekcija podložna brojnim terapijskim alternativama, jer većina pacijenata sa nekomplikovanom kliničkom slikom dobro reaguje na terapiju CQ (Vadivelan i Dutta, 2014) i kombinaciju CQ - PQ.

Osobe koje putuju u regije endemske malarije su pod visokim rizikom od zaraze, te je neophodna upotreba lekova u cilju profilakse. Profilaktička aktivnost podrazumeva

sprečavanje infekcije sporozoitnim oblicima parazita ili inhibiciju parazita na nivou hepatocita tj. EE fazu (prevencija ulaska parazita u E fazu). Ovaj efekat imaju pirimetamin, progvanil i atovakvon, a profilaktička terapija prvog izbora je kombinacija atovakvon-progvanil (Malarone®).

1.7. PROBLEMI U TERAPIJI MALARIJE

U prethodnom tekstu je detaljno opisan arsenal lekova koji se primenjuju u terapiji malarije. I pored velikog broja antimalarika u primeni, na žalost se ne može reći da je ovim i rešeno pitanje terapije ovog oboljenja. Glavni razlozi leže u pojavi i progresivnom širenju rezistencije parazita na postojeće lekove, a vektora plazmodijuma na insekticide. S druge strane, uprkos svim naporima profilaksa infekcije putem bezbedne i efikasne vakcine još uvek ne postoji.

1.7.1. REZISTENCIJA NA POSTOJEĆE ANTIMALARIKE

SZO je definisala rezistenciju plazmodijuma na antimalarike davne 1963. godine kao „sposobnost parazita da se razmnožava ili da preživi u prisustvu leka u koncentraciji koja uobičajeno uništava parazite iste vrste ili sprečava njihovo razmnožavanje“. Međutim, najraniji zapis o rezistenciji na antimalarike datira još iz 1910. godine kada je u Brazilu prijavljena neosetljivost *P. falciparum* na kinin, lek koji je tada u velikoj meri korišćen (Spencer, 1985). CQ je uveden u terapiju 1945. godine, a prvi slučajevi rezistencije uočeni su već 1960-ih godina (Peters, 1987; Payne D, 1987; Trape i sar., 1989) u oblasti oko tajlandsko-kambodžanske granice, koja se brzo proširila na čitavu južnu Aziju i Indiju, pa i po Južnoj Americi, a u roku od 10 godina i na većinu afričkih zemalja u kojima je malarija endemska bolest (Wellems i Plowe, 2001; D'Alessandro i Buttiens, 2001). Sa širenjem rezistencije na CQ, mnoge zemlje su kao terapiju prvog izbora uvele Fansidar®. Međutim, rezistencija na ovu terapiju se razvila još brže, te je u jugoistočnoj Aziji upotreba napuštena nakon samo pet godina primene (Sibley i sar., 2001; Wongsrichanalai i sar., 2002). MQ je uveden u terapiju 1980. godine, kao lek prvog izbora na Tajlandu. Na početku primene MQ je bio izuzetno efikasan u terapiji *P. falciparum* malarije rezistentne na CQ, ali je rezistencija i na ovaj lek nastala samo

nekoliko godina po uvođenju. ART i njegovi derivati (artesunat, artemeter i dihidroartemizinin) se u terapiju uvode 1980-ih godina, a deset godina kasnije prvi put je primenjena ACT na teritoriji Azije koja se pokazala kao veoma efikasna u terapiji *P. falciparum* malarije. Nažalost, u prvoj deceniji XXI veka počinju da se prijavljuju prvi slučajevi rezistencije parazita (Denis i sar., 2006b; Alker i sar., 2007; Dondorp i sar., 2009) na artemizininski derivat i na sporodelujući lek. Delimična rezistencija samo na artemizininski preparat (Carrara i sar., 2013; Ashley i sar., 2014; Hott i sar., 2015) dovodi do usporene eliminacije parazita, ali - za sada - ne dovodi do neuspeha lečenja. Međutim, sporodelujući lek mora da ukloni veći deo parazita i na taj način se ugrožava njegova buduća efikasnost. Takođe, moguća je pojava rezistencije i na sporodelujući lek (Thu i sar., 2017), koja ne mora biti praćena artemizininskom rezistencijom. U ovom slučaju postoji visok rizik od neuspeha terapije jer je lek partner neophodan za uklanjanje preostalih parazita (White NJ, 2016). Zbog njihovih različitih uloga, efikasnost artemizinina i leka partnera mora da se prati istovremeno, ali svakog za sebe. Iako je rezistencija na artemizininski derivat i na sporodelujući antimalarik prijavljena u jugoistočnoj Aziji (u široj regiji Mekonga) (White LJ i sar. 2015; Imwong i sar., 2017), u Africi do sada nije prijavljena rezistencija na brzodelujuće artemizininske preparate, tako da na ovom području ACT ostaje terapija prvog izbora. Na kraju treba istaći da je globalni zdravstveni prioritet u lečenju malarije očuvanje efikasnosti ACT.

Rezistencija na primenjeni pojedinačni antimalarik ili kombinovanu terapiju se javlja kao posledica spontanijh mutacija, pa se tako i rezistencija na CQ javlja usled tačkastih mutacija u okviru tri *P. falciparum* genska lokusa: *P. falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr1)*, *P. falciparum multidrug resistance proteins 1 i 2*. Ovi geni redom kodiraju transmembranske transportne proteine (kanale) u membrani HV: *P. falciparum chloroquine resistance transporter (PfCRT)*, *P-glycoprotein homologue 1* i *P. falciparum multidrug resistance protein*. Parazitska rezistencija se manifestuje smanjenom akumulacijom leka u HV jer su navedeni proteini uključeni u mehanizme efluksa CQ. *Pfcr1* koji kodira PfCRT kanal je genski lokus od najvećeg značaja za nastanak parazitske rezistencije na CQ (Wellems i sar., 1991), dok mutacije na druga dva lokusa u manjoj meri doprinose razvoju rezistencije (Fidock i sar., 2000). PfCRT kanal je protein sa deset transmembranskih domena (Fidock i sar., 2000; Cooper i sar., 2002) a istraživanjem njegove strukture utvrđeno je da se prirodnom selekcijom uvek favorizuje

K76T mutacija na prvom transmembranskom domenu (Durand i sar., 2001). Posledica ove mutacije je uklanjanje pozitivnog naelektrisanja u supstrat vezujućem mestu PfCRT kanala i time je omogućeno da protonovani CQ napuša HV niz elektrohemijski gradijent (Bray i sar., 2005). Dakle povećava se efluks CQ iz HV (Martin RE i sar., 2009) i posledično dolazi do smanjenja koncentracije CQ u HV ispod vrednosti potrebnih da spreči polimerizaciju hema.

Interesantno je pomenuti, a i potencijalno veoma značajno, da je povlačenjem CQ iz upotrebe u terapiji *P. falciparum* malarije u geografskim područjima u kojima postoji rezistencija uočeno da se nakon određenog vremena može ponovo pojaviti osetljivost parazita na ovaj lek (Frosch i sar., 2011). Jedan od primera je Republika Malavi, prva afrička zemlja u kojoj je CQ povučen iz upotrebe 1993. godine (Kublin i sar., 2003), a studije Laufer i saradnika su pokazale da je 12 godina kasnije CQ ponovo postao efikasan u terapiji malarije (Laufer i sar., 2006; Laufer i sar., 2010).

1.7.2. REZISTENCIJA VEKTORA NA INSEKTICIDE

Kao što je prethodno navedeno, za kompletiranje životnog ciklusa *Plasmodium* parazita i prenošenje malarije neophodno je postojanje biološkog vektora, komarca roda *Anopheles*. Jedan od načina da se prekine prenošenje malarije jeste smanjenje broja vektora ili ometanja njegove sposobnosti da učestvuje u životnom ciklusu *Plasmodium* parazita upotrebom insekticida. Mreže tretirane insekticidom predstavljaju oruđe za prevenciju malarije (Ranson i Lissenden, 2016). Međutim, kao posledica kontinuirane primene insekticida, rezistencija na piretroide, jedinu klasu insekticida koja se trenutno koristi za tretiranje mreža za zaštitu od komaraca, progresivno se širi (Churcher i sar., 2016; Alout i sar., 2017). O tome svedoči podatak da je procenat zemalja endemske malarije koje su prijavile rezistenciju na piretroide porastao sa 71% u 2010. na 81% u 2016. godini (World Health Organization, 2017).

1.7.3. RAZVOJ VAKCINE PROTIV MALARIJE

Vakcine su nezamenljivo sredstvo u borbi protiv infektivnih bolesti, koje su ograničile širenje brojnih zaraznih bolesti virusnog i bakterijskog porekla. Međutim,

protiv parazitskih infekcija ne postoje vakcine u opštoj upotrebi, a uzrok tome je kompleksnost parazita. Činjenica da paraziti u organizmu domaćina prolaze kroz više razvojnih faza, karakterisanih velikim brojem različitih antigena, čini razvoj vakcina protiv parazitskih infekcija mnogo složenijim. Tako je i razvoj vakcine protiv malarije otežan zbog antigenske varijacije (Hoffman i sar., 2015) i elaboriranih mehanizama izbegavanja imunskog odgovora domaćina (Rénia i Goh, 2016). Vakcina može biti usmerena na svaku od tri faze u životnom ciklusu malaričnog parazita: EE (prevencija invazije hepatocita), E (prevencija invazije Er) i fazu u komarcu (zaustavljanje životnog ciklusa u komarcu) (Mishra i sar., 2017). Ispitivan je eventualni imunogeni potencijal i vakcinalni efekat više od 30 različitih antigena (Verma i sar., 2013) koji bi mogli da uđu u sastav vakcine protiv malarije. Na kraju, višedecenijska istraživanja na ovom polju dala su nekoliko kandidata koji su stigli do II faze kliničkih ispitivanja, ali su rezultati uglavnom bili razočaravajući (Sauerwein i sar., 2011). Najzad, izdvojila se subjedinična injekciona vakcina RTS,S, koja za cilj ima zaštitu od malarije izazvane vrstom *P. falciparum* (Ballou, 2009). Rezultati ispitivanja efikasnosti u III fazi kliničkih ispitivanja pokazali su da ova vakcina štiti decu i odojčad od malarije najmanje tri godine nakon prve vakcinacije. Međutim, pokazala je samo skromnu efikasnost (Foquet i sar., 2014), tj. nedovoljan nivo zaštite da bi se postigla eradikacija malarije (Arama i Troye-Blomberg, 2014), tako da, dok se čeka sprovođenje faze IV kliničkih ispitivanja za RTS,S, potraga za novim kandidatima se nastavlja (Matuschewski, 2017).

1.8. OTKRIĆE NOVIH ANTIMALARIKA

Potruga za novim antimalarikom i optimizacija aktuelnih protokola za terapiju malarije su već decenijama konstantni predmet interesovanja naučnika širom sveta. S jedne strane je pristup da se postojeći lekovi i potvrđena naučna saznanja iskoriste za unapređenje terapije malarije, a sa druge strane je koncept *de novo* sinteze. Kao što je prethodno navedeno ACT je zasnovana na istovremenoj upotrebi artemizininskog derivata i antimalarika druge grupe čiji efekti se međusobno dopunjuju. Takođe se ispituju potencijalni antimalarijski efekti lekova registrovanih za terapiju drugih bolesti. Tako je, npr, pokazano da antiretrovirusni lek lopinavir, kojim se tretiraju osobe zaražene virusom humane imunodeficijencije, deluje i antiplazmodijalno (Nsanzabana i Rosenthal, 2011).

Zatim, od pomoći u optimizaciji postojećih terapijskih opcija mogu biti i jedinjenja za koja je dokazano da umanjuju rezistenciju na postojeće antimalarike (eng. *drug resistance reversers*), pa tako postoje dokazi da kardiovaskularni lek verapamil u kombinaciji sa CQ smanjuje nivo rezistencije parazita (Martin SK i sar., 1987; Henry i sar., 2008). Složeniji i vremenski neuporedivo duži put je *de novo* sinteza jedinjenja sa potencijalnim antimalarijskim efektom. Jedan od pristupa je modifikacija postojećih struktura sa ciljem da se postigne bolja efikasnost i terapija prilagodi kompleksnom životnom ciklusu parazita (Fidock i sar., 2004; Aguiar i sar., 2012), često polazeći od jedinjenja izolovanih iz prirodnih proizvoda i njihovih derivata za koje se zna da poseduju antimalarijski potencijal (kinin, ART). Jedan od praktičnih pristupa jeste biterapija koja podrazumeva kovalentno vezivanje dve farmakofore koje deluju na istu ili različitu parazitsku metu različitim mehanizmima delovanja (primer 1,2,4-trioksana i 4-aminohinolina). Vrlo zahtevan pristup je razvoj jedinjenja koja bi bila aktivna protiv novih parazitskih meta.

Čak i površnim pregledom literature uočava se da su se aminohinolini oduvek nalazili u fokusu kao strukture čijom modifikacijom mogu nastati novi potentniji derivati (Šolaja i sar., 2008; Casagrande i sar., 2012; Manohar i sar., 2012; Sáenz i sar., 2012; Tukulula i sar., 2013) čijom primenom bi se prevazišla rezistencija nastala usled prekomerne upotrebe i genetičkih mutacija. Najviše obećavaju sintetski hinolinski derivati (Kaur i sar., 2010), naročito ako su aktivni prema soju *P. falciparum* rezistentnom na CQ (Opsenica i sar., 2011; Opsenica i sar., 2013), dok su za hemijske modifikacije najpogodnije strukture 4-aminohinolini (O'Neill i sar., 1998). Kao što je detaljno objašnjeno u delu 1.6.1.1. aminohinolini svoju antimalarijsku aktivnost ispoljavaju na nivou HV parazita. Osnovni cilj je pronaći nova jedinjenja koja neće biti prepoznata od strane mutiranog transportera i samim tim neće biti izbačena iz HV parazita. Napori da se pronađu nove aminohinolinske strukture uključuju prevazilaženje rezistencije plazmodijuma hemijskim modifikacijama koje do sada nisu vršene, a na kojima se širom sveta kontinuirano radi.

2. CILJ RADA

Terapija malarije godinama unazad predstavlja problem globalnih razmera, a pronalazak novog bezbednog, efikasnog i ekonomski dostupnog antimalarika je izazov kako za farmaceutsku industriju tako i za istraživače.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje potencijalne antimalarijske aktivnosti novosintetisanih aminohinolina sa inovativnim hemijskim modifikacijama na aminohinolinskom prstenu i bočnom lancu u *in vitro* i *in vivo* model sistemima. Jedinjenja su sintetisana na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Opšti cilj ovog istraživanja je bio proširenje arsenala postojećih struktura koje su kandidati za antimalarike, iznalaženjem novih jedinjenja sa antimalarijskim potencijalom, dok je uži cilj bio ispitivanje uticaja specifičnih strukturnih modifikacija na antimalarijski efekat kao doprinos utvrđivanju njihovog mehanizma dejstva.

Da bi cilj bio ostvaren, postavljeni su sledeći zadaci rada :

- Uspostavljanje *in vitro* model sistema za kultivaciju *Plasmodium* sojeva,
- Ispitivanje antimalarijske aktivnosti novosintetisanih jedinjenja u odabranom *in vitro* sistemu,
- Uspostavljanje *in vivo* model sistema za održavanje *Plasmodium*-a,
- Utvrđivanje antimalarijske aktivnosti jedinjenja u odabranom *in vivo* sistemu.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA

Antimalarijska aktivnost novosintetisanih aminohinolinskih jedinjenja ispitana je u dva model sistema: *in vitro*, u kulturi humanih Er inficiranih vrstom *P. falciparum*, i *in vivo*, na ženkama miševa soja C57BL/6 inficiranih vrstom *P. berghei*.

Inicijalno je urađen skrining svih jedinjenja u *in vitro* sistemu, korišćenjem enzimskog testa kojim se meri aktivnost parazitske laktat dehidrogenaze (LDH esej). Jedinjenja koja su u definisanoj koncentraciji ispoljila efekat $\geq 50\%$ inhibicije rasta parazita bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum*, osetljivog (3D7) i rezistentnog na CQ (Dd2), odabrana su za dalju titraciju u istom modelu, u cilju određivanja koncentracije jedinjenja kojom se postiže 50% inhibicije rasta parazita (IC₅₀ vrednost). Odabir jedinjenja za ispitivanje antimalarijske efikasnosti u *in vivo* uslovima izvršen je na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem u *in vitro* sistemu.

U okviru ispitivanja u *in vivo* sistemu, prvo su zdravi (neinficirani) eksperimentalni miševi tretirani odabranim jedinjenjima jednom određenom dozom, istoj za sva jedinjenja, i ona za koja je kliničkim praćenjem pokazano da su ispoljila toksične efekte isključena su iz daljih ispitivanja. S druge strane, jedinjenja za koja je ovim eksperimentima pokazano da nisu toksična dalje su ispitana na antimalarijsku aktivnost u mišjem modelu eksperimentalne malarije, u istoj i/ili dvostruko nižoj dozi u odnosu na onu u kojoj su primenjena za ispitivanje toksičnosti. U slučaju da je terapija imala pozitivan učinak na preživljavanje miševa, jedinjenja su primenjena i u seriji dvostruko nižih doza. Parametri efikasnosti ispitivanih jedinjenja su bili procenat i dužina preživljavanja inficiranih miševa, kao i prisustvo parazita u krvi (parazitemija) u toku i

na kraju terapije. Parazitemija je praćena mikroskopski, a u slućaju mikroskopskog nalaza negativnog na *P. berghei* dodatno je raćena molekularna potvrda prisustva DNK *P. berghei* u uzorcima krvi i tkiva jetre preživelih životinja.

U cilju provere korelacije rezultata dobijenih ispitivanjem aktivnosti jedinjenja u *in vitro* i *in vivo* sistemima, u eksperimente na životinjama takoće je predvićeno da budu ukljućena i neka jedinjenja koja su ispitivanjem u *in vitro* sistemu prema oba soja pokazala višu IC₅₀ vrednost od kontrolnog jedinjenja.

3.2. MATERIJAL

3.2.1. PARAZITI

U istraćivanju su korišćene dve vrste *Plasmodium*-a: *P. falciparum* koji je izazivać malarije kod ljudi i *P. berghei* koji izaziva malariju kod glodara. Eksperimenti u *in vitro* uslovima izvoćeni su na dva razlićita soja *P. falciparum* i to na soju 3D7 koji je osetljiv na CQ (CQ^S) i na soju Dd2 koji je rezistentan na CQ (CQ^R). Za eksperimente koji su izvoćeni u *in vivo* sistemu korišćen je ANKA soj *P. berghei*. Navedeni sojevi se već godinama odrćavaju u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima (Centar) i izmeću eksperimenata se ćuvaju na -70°C.

3.2.1.1. Odrćavanje parazita vrste *P. falciparum*

*3.2.1.1.1. Kultivacija *P. falciparum* u humanim Er*

P. falciparum je kultivisan u humanim Er, prema metodi Tragera i Jensena (Trager i Jensen, 1976). Sve procedure su izvoćene u specijalnim radnim prostorijama, u Laboratoriji za kulture ćelija Centra, pod sterilnim uslovima u laminarnoj komori *MSC-Advantage*TM (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, SAD).

Za uspostavljanje kulture *P. falciparum* (humani Er inficirani *P. falciparum*, iEr), njenu propagaciju i izvoćenje eksperimenata korišćeni su GibcoTM RPMI 1640 medijum (medijum) obogaćen sastojcima navedenim u Tabeli 1 (Schuster, 2002; Singh K i sar., 2007) i sveži neinficirani Er (niEr) dobijani iz venske krvi dobrovoljnih davalaca,

saradnika Centra. Uzimano je po 10 mL venske krvi iz koje su nakon centrifugovanja uklanjani plazma i prsten leukocita i trombocita, a niEr su po ispiranju fosfatnim puferom resuspendovani u jednakoj količini medijuma. Medijum i niEr u medijumu skladišteni su na +4°C. Svi reagensi nabavljeni su od proizvođača *Thermo Scientific* (Waltham, MA, SAD).

Uspostavljanje kulture iEr, koji su čuvani zamrznuti na -70°C, vršeno je sterilnim rastvorima natrijum-hlorida različitih koncentracija (12%, 1,6%, 0,9%). Nakon odmrzavanja iEr su resuspendovani u medijumu i dodati su im niEr. Kulture iEr uspostavljene na ovaj način su dalje održavane u inkubatoru *HERAcell[®] 150i* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, SAD) na 37°C.

Tabela 1. Sastojci za obogaćivanje RPMI medijuma

Sastojak	Zastupljenost (%)	Uloga
AlbuMAX [®] , serum albumin	2,6	izvor faktora rasta
L-glutamin, aminokiselina	1	izvor azota
Hipoksantin	0,24	izvor purina
Gentamicin, antibiotik	0,1	sprečavanje kontaminacije
Hepes, pufer	3,4	održavanje pH vrednosti

Parametri na osnovu kojih je praćena uspostavljena kultura iEr bili su parazitemija i hematokrit. Parazitemija je određivana kao odnos broja iEr prema ukupnom broju Er (niEr i iEr), dok je hematokrit odnos zapremine svih Er (niEr i iEr) u ukupnoj zapremini suspenzije.

Provera parazitemije je vršena uzorkovanjem krvi i mikroskopiranjem krvnog razmaza tri puta nedeljno. U istim vremenskim tačkama za uzorkovanje krvi vršena je i zamena medijuma kulturi iEr. Na osnovu vrednosti parazitemije određivana je količina niEr koje je trebalo dodati u cilju podešavanja parazitemije i hematokrita. Naime, da bi se kultura iEr pravilno razvijala, smatra se da je optimalna vrednost parazitemije između redovnih pasaža ispod 2%, a hematokrita 4-5%, za pasaže koje se vrše na 48h, odnosno dvostruko niža (2-2,5%) ukoliko se pasaže vrše na 72h.

Razmaz je pripreman nanošenjem male kapi krvi (do 5 μ L) na terminalni deo mikroskopske pločice. Drugom pločicom, postavljenom pod uglom od 45°C, naglim povlačenjem pravljen je što tanji razmaz da bi se izbeglo preklapanje Er. Nakon sušenja, vršeno je fiksiranje metanolom 20 sekundi i nakon toga bojenje 10% rastvorom *Giemsa-e* (*Merck*, Darmstadt, Nemačka) u trajanju od 20 minuta. Preparati su ispirani pod slabim mlazom tekuće vode i nakon toga u vertikalnom položaju sušeni na sobnoj temperaturi. Krvni razmazi su posmatrani pod imerzijom, svetlosnim mikroskopom (*Axioskop 2 plus*, *Carl Zeiss Microscopy GmbH*, Jena, Nemačka) na uveličanju 1000X. Mikroskopirano je do 500 Er, koji su potom slikani i prebrojani.

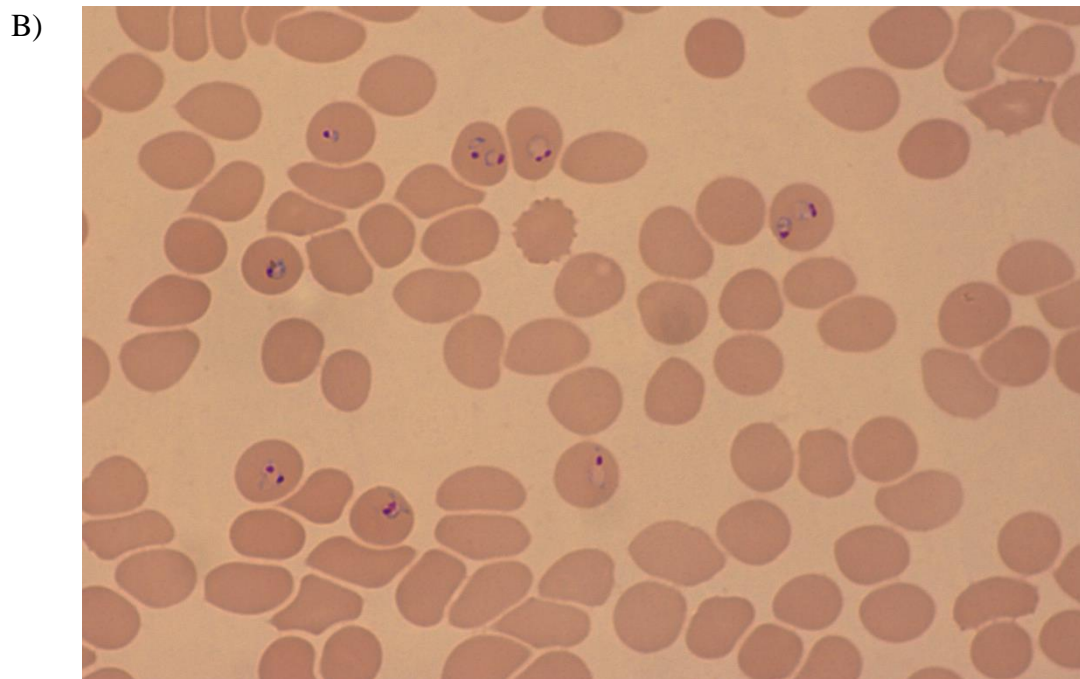
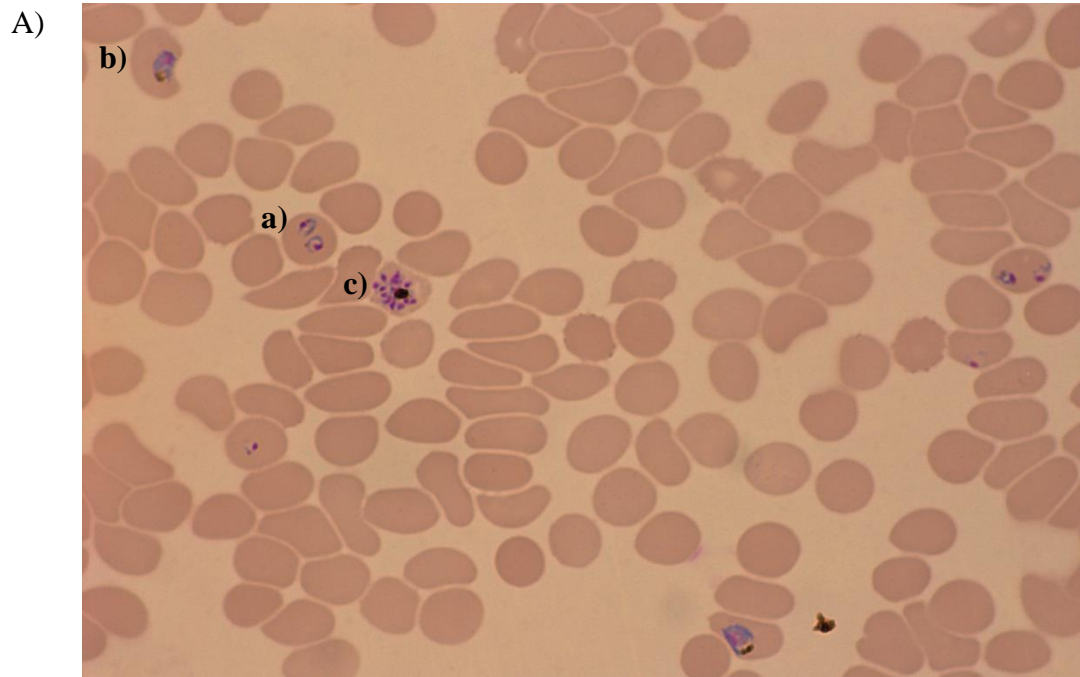
3.2.1.1.2. Sinhronizacija *P. falciparum* u kulturi humanih Er

U *in vitro* uslovima često su istovremeno prisutni različiti razvojni oblici parazita (parazit u stadijumu prstena, trofoblast i šizont) u Er, odnosno kulture iEr su asinhrono (Slika 3A). Za potrebe izvođenja eksperimenata neophodna je sinhronizovana kultura iEr koja sadrži samo parazite u ranoj fazi razvoja odnosno stadijumu prstena. Sinhronizacija se postiže primenom D-sorbitola (Slika 3B) koji dovodi do lize Er inficiranih parazitima u kasnijim stadijumima (trofoblast i šizont), dok rani intraeritrocitni paraziti u stadijumu prstena preživljavaju (Schuster, 2002). Kulture iEr su sinhronizovane sterilnim rastvorom 5% D-sorbitola jednom nedeljno.

3.2.1.1.3. Krioprotekcija kulture iEr

Prethodno navedenim metodološkim procedurama kultura iEr je održavana za potrebe izvođenja eksperimenata u *in vitro* sistemu.

Kada su *P. falciparum* paraziti u stadijumu prstena, a parazitemija visoka (>5%) kultura je bila pogodna za zamrzavanje. Za krioprotekciju je korišćen sterilan rastvor glicerolita u kome je kultura odlagana na -70°C do ponovne potrebe za uspostavljanjem.



Slika 3. Humani Er inficirani 3D7 sojem *P. falciparum*, bojenje po *Giemsa*-i, svetlosni mikroskop, uveličanje 1000X, A) asinhrona kultura ((a) ring, (b) trofozoit, (c) šizont), B) sinhronizovana kultura sa parazitima u ranoj fazi (ring).

3.2.1.2. Održavanje parazita vrste *P.berghei*

Mišji Er inficirani ANKA sojem *P. berghei* su čuvani zamrznuti na -70°C u 30% rastvoru glicerola. Za pripremu potrebne količine parazita za planirane eksperimente u *in vivo* uslovima Er su odmrzavani i intraperitonealno (i.p.) inokulisani u dve ženke miševa soja C57BL/6 (miš donor). Soj je održavan kroz serijske i.p. pasaže koje su vršene dva puta nedeljno, nakon 48h odnosno 72h, zavisno od izračunatih vrednosti parazitemije, i to u periodu od dve do tri nedelje koliko je bilo potrebno da se dostigne željeni prinos parazita.

3.2.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Za eksperimente u *in vivo* uslovima korišćeni su miševi soja C57BL/6 (Slika 4) osetljivog na infekciju *P. berghei*, nabavljeni na Odeljenju za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu. Korišćene su ženke, telesne mase 19-21g na početku eksperimenta.

Po dopremanju sa VMA, miševi su čuvani u vivarijumu IMI, u posebnoj prostoriji namenjenoj Centru. Držani su u odgovarajućim kavezima, izlagani prirodnim uslovima svetlosti i tame, hranjeni uobičajenom peletiranom hranom za miševе i napajani vodom *ad libitum*.

Miševi su razvrstavani u grupe od pet do šest ženki po kavezu, u zavisnosti od eksperimenta. Životinje u okviru istog kaveza bile su obeležene farbanjem vrha repa različitim bojama, čime je omogućeno praćenje svakog pojedinačnog miša tokom celog eksperimenta.

Po završetku eksperimenta preživele životinje su bile žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Krv je uzorkovana iz leve srčane komore, dok su organi (jetra, slezina, pluća) u celosti izvađeni.

Sve eksperimentalne procedure na miševima odobrene su od strane Etičkog saveta za rad sa eksperimentalnim životinjama (rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine br. 323-07-02444/2014-05/1).



a)



b)



c)

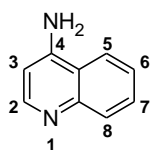
Slika 4. Ženke miševa soja C57BL/6 ((a) izgled, (b) merenje, (c) obeležavanje)

3.2.3. JEDINJENJA

U okviru ovog istraživanja ispitana je antimalarijska aktivnost serije od 37 novih aminohinolina sintetisanih u grupi prof. dr Bogdana Šolaje na Hemijskom fakultetu BU (Opsenica i sar., 2013; Terzić i sar., 2016; Konstantinović i sar., 2017). Među njima, 30 su 4-aminohinolini (Slika 5), dok je sedam 2-aminohinolina. Nazivi i strukturne formule svih ispitivanih jedinjenja predstavljani su u Tabelama 2 i 3.

Na osnovu razlika na osnovnom, aminohinolinskom jezgru, tj. prisustva ili odsustva fluora i/ili hlora, jedinjenja su svrstana u sledećih pet grupa:

- 1) 4-aminohinolini (AQ) (n = 5 jedinjenja)
- 2) 7-hlor-4-aminohinolini (CIAQ) (n = 15 jedinjenja)
- 3) 3-fluor-4-aminohinolini (FAQ) (n = 2 jedinjenja)
- 4) 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolini (FCIAQ) (n = 8 jedinjenja)
- 5) 3-fluor-7-hlor-2-aminohinolini (FCI2AQ) (n = 7 jedinjenja)



Slika 5. Struktura 4-aminohinolinskog jezgra

Jedinjenja su se razlikovala i na osnovu bočnog lanca. Strukture modaliteta prikazane su u Tabeli 4. U ispitivanoj seriji, kod 19 jedinjenja prisutan je adamantan kao nosač, benzotiofen je nosač za osam struktura, dva jedinjenja sadrže tiofenski prsten, četiri jedinjenja benzenov prsten, dok su preostala četiri jednostavne strukture (Tabela 5).

Tabela 4. Strukture modaliteta bočnog lanca ispitivanih aminohinolina

	adamantan	benzotiofen	tiofen	benzen
Strukturna formula				

Za izvođenje eksperimenata u *in vitro* sistemu, jedinjenja su rastvarana u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentraciji 50 mM. Dalje rastvaranje jedinjenja do željenih koncentracija vršeno je u istom (kompletnom RPMI 1640) medijumu (finalna koncentracija DMSO $\leq 0,2\%$).

Za izvođenje eksperimenata u *in vivo* uslovima, jedinjenja su takođe rastvorena u DMSO, a zatim do željene doze stavljana u nosač čiji su sastav činili 0.5% HEC i 0.1% Tween 80 u autoklaviranoj dH₂O.

Tabela 2. Nomenklatura ispitivanih aminohinolina

Grupa	Akronim	Naziv jedinjenja	Referenca*	Br. jedinjenja u referenci
AQ	AQ1	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -hinolin-4-ilbutan-1,3-diamin	B	24
	AQ2	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -hinolin-4-ilbutan-1,3-diamin	B	44
	AQ3	N -(1-adamantilmetil)- N -metil- N' - hinolin-4-ilpropan-1,3-diamin	Neobjavljena sinteza	
	AQ4	N -[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]- N' -hinolin-4-ilpropan-1,3-diamin	C	23
	AQ5	4-{5-[4-({metil[8-(hinolin-4-ilamino)oktil]amino)metil]fenil]-2-tienil}benzonitril	C	46
CIAQ	CIAQ1	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin	B	23
	CIAQ2	N^2 -(1-adamantilmetil)- N^1 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin	B	10
	CIAQ3	N -(7-hlorhinolin-4-il)- N' -[(5-fluor-1-benzotien-3-il)metil]propan-1,3-diamin	B	58
	CIAQ4	N -(7-hlorhinolin-4-il)- N' -[(5-fluor-1-benzotien-3-il)metil]butan-1,4-diamin	B	63
	CIAQ5	N -(7-hlorhinolin-4-il)- N' -[(6-fluor-1-benzotien-3-il)metil]propan-1,3-diamin	B	59
	CIAQ6	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin	B	36
	CIAQ7	N -(1-benzotien-3-ilmetil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)etan-1,2-diamin	B	55
	CIAQ8	N -(1-benzotien-3-ilmetil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,4-diamin	B	57
	CIAQ9	N^4 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]pentan-1,4-diamin	C	25
	CIAQ10	3-[(3-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]propil)amino]metil]-1-benzotiofen-6-karbonitril	B	61
	CIAQ11	4-(5-[4-[(8-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]oktil)amino]metil]fenil]-2-tienil)benzonitril	C	42
	CIAQ12	N -benzil- N' -(7-hlorhinolin-4-il)etan-1,2-diamin	A	6
	CIAQ13	N -benzil- N' -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,3-diamin	A	7
	CIAQ14	N -(4-brombenzil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)etan-1,2-diamin	A	14
	CIAQ15	N -(4-brombenzil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,3-diamin	A	15
FAQ	FAQ1	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin	B	26
	FAQ2	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -(3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin	B	39
FCIAQ	FCIAQ1	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin	B	25
	FCIAQ2	N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)- N^1,N^1 -dietilpentan-1,4-diamin	B	74
	FCIAQ3	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^2 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin	B	20
	FCIAQ4	N^2 -(1-adamantilmetil)- N^1 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin	B	21
	FCIAQ5	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin	B	38
	FCIAQ6	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)pentan-1,4-diamin	B	32
	FCIAQ7	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)pentan-1,4-diamin	B	45
	FCIAQ8	N' -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)- N,N -dietilpropan-1,3-diamin	B	73
FC12AQ	FC12AQ1	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^2 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)propan-1,2-diamin	B	68
	FC12AQ2	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)butan-1,3-diamin	B	69
	FC12AQ3	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)butan-1,3-diamin	B	71
	FC12AQ4	N^1 -(1-adamantilmetil)- N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)pentan-1,4-diamin	B	70
	FC12AQ5	N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)pentan-1,4-diamin	B	72
	FC12AQ6	N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)- N^1,N^1 -dietilpentan-1,4-diamin	B	76
	FC12AQ7	N' -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)- N,N -dietilpropan-1,3-diamin	B	75

AQ 4-aminohinolini; CIAQ 7-hlor-4-aminohinolini; FAQ 3-fluor-4-aminohinolini; FCIAQ 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolini; FC12AQ 3-fluor-7-hlor-2-aminohinolini; *u kojoj je objavljena sinteza jedinjenja; A - Opsenica i sar., 2013; B - Terzić i sar., 2016; C - Konstantinović i sar., 2017

Tabela 3. Strukturne formule ispitivanih aminohinolina

AQ	1		2		3	
	4		5			
CIAQ	1		2		3	
	4		5		6	
	7		8		9	
	10		11		12	
	13		14		15	
FAQ	1		2			
FCIAQ	1		2		3	
	4		5		6	
	7		8			
FCI2AQ	1		2		3	
	4		5		6	
	7					

AQ 4-aminohinolini; CIAQ 7-hlor-4-aminohinolini; FAQ 3-fluor-4-aminohinolini; FCIAQ 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolini; FCI2AQ 3-fluor-7-hlor-2-aminohinolini

Tabela 5. Ispitivani aminohinolin svrstani na osnovu različitih modaliteta u bočnom lancu

Adamantanska jedinjenja			
Benzotiofenska jedinjenja			
Jedinjenja sa tiofenskim prstenom			
Jedinjenja sa benzenovim prstenom			
Jedinjenja jednostavnih struktura			

AQ 4-aminohinolini; CIAQ 7-hlor-4-aminohinolini; FAQ 3-fluor-4-aminohinolini; FCIAQ 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolini; FCI2AQ 3-fluor-7-hlor-2-aminohinolini

3.3. METODE

3.3.1. ODREĐIVANJE ANTIMALARIJSKE EFIKASNOSTI JEDINJENJA U *in vitro* SISTEMU

Određivanje antimalarijske aktivnosti novosintetisanih jedinjenja u *in vitro* sistemu vršeno je korišćenjem LDH eseja (Makler i sar., 1993). LDH esejom se prisustvo i vijabilnost *P. falciparum* u uzorku određuju indirektno, merenjem aktivnosti visokostabilnog enzima parazitske laktat dehidrogenaze (pLDH) koja je proporcionalna stepenu rasta parazita.

Inicijalno ispitivanje aktivnosti svih jedinjenja vršeno je u koncentraciji od 500 nM, dok su odabrana jedinjenja dalje titrirana u cilju određivanja IC₅₀ vrednosti. Za svako jedinjenje su izvedena tri nezavisna eksperimenta za svaki soj *P. falciparum* (3D7, Dd2), sa po tri ponovka u okviru eksperimenta. Kao pozitivna kontrola je korišćena IC₅₀ vrednost CQ. Jedinjenja su ispitana u osam koncentracija dobijenih dvostrukim razblaživanjem počev od koncentracije od 256 nM ili 1000 nM, u zavisnosti od rezultata inicijalnog ispitivanja aktivnosti.

3.3.1.1. Izvođenje LDH eseja

Test je izvođen u mikrotitarskim pločama sa 96 mesta i ravnim dnom i to kada je kultura *P. falciparum* sinhronizovana do stadijuma prstena, parazitemija podešena na 1-2%, a hematokrit na 0,75% (Slika 6). niEr rastvoreni u medijumu bili su slepa proba za test (blank), dok su iER rastvoreni u medijumu bili kontrola za test (pozitivna kontrola). Uzorke su predstavljali iER inkubirani sa definisanim koncentracijama ispitivanih jedinjenja. Početna koncentracija ispitivanog jedinjenja u ploči bila je 512 nM ili 2000 nM i od nje su pravljena dvostruka razblaženja u medijumu. Nakon toga dodavano je po 100 µL prethodno pripremljene parazitske kulture. Finalni volumen u svim bunarima bio je 200 µL. Ivični bunari sadržali su čist medijum da bi se obezbedilo održavanje vlažnosti (Slika 8). Ploče su inkubirane u inkubatoru HERAcell® 150i (*Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD*) na 37°C i nakon 48h sledila su tri ciklusa odmrzavanja/zamrzavanja. Ploče su zamrzavane na -20°C (20 minuta), a zatim odmrzavane u inkubatoru (20 minuta). Nakon toga merena je količina oslobođenog pLDH enzima.

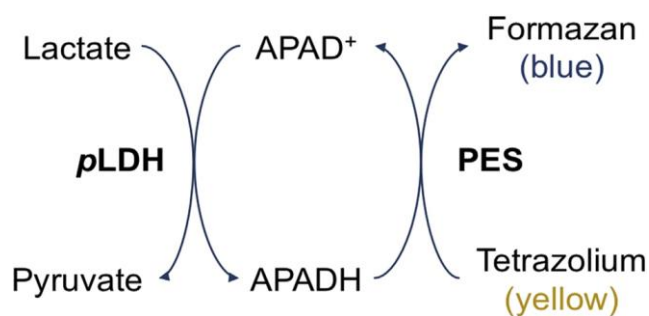
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		KONTROLA	2 nM	4 nM	8 nM	16 nM	32 nM	64 nM	128 nM	256 nM	BLANK	
B		200µL	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	200µL jedinjenja 1	200µL	
C		200µL	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	200µL jedinjenja 1	200µL	
D		200µL	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	200µL jedinjenja 1	200µL	
E		200µL	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	200µL jedinjenja 2	200µL	
F		200µL	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	200µL jedinjenja 2	200µL	
G		200µL	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	100µL medijuma	200µL jedinjenja2	200µL	
H		KONTROLA									BLANK	

Odbaciti 100 µL 100 µL 100 µL 100 µL 100 µL 100 µL 100 µL 100 µL

Slika 6. Shematski prikaz pravljenja dvostrukih razblaženja ispitivanih jedinjenja u mikrotitarskoj ploči

3.3.1.2. Bojenje LDH eseja

Plasmodium parazit koristi anaerobnu glikolizu kako bi stvorio energiju tokom intraeritrocitne faze razvoja. pLDH je poslednji enzim u glikolitičkom putu koji prevodi laktat u piruvat uz 3-acetilpiridin adenin dinukleotid (APAD) kao koenzim. U tom procesu APAD se redukuje do APADH, koji zatim redukuje žutu tetrazolijumovu so (eng. *nitro blue tetrazolium*, NBT) u plavi formazan u prisustvu fenazin etosulfata (eng. *phenazine ethosulfate*, PES). Na principu ovog procesa (Slika 7) zasnovana je spektrofotometrijska detekcija i merenje količine pLDH enzima prisutnog u suspenziji parazita nakon inkubacije sa ispitivanim jedinjenjem.



Slika 7. Anaerobna glikoliza *Plasmodium* parazita (preuzeto iz Markwalter i sar., 2016)

Smešu za bojenje su činili Malstat reagens i rastvor NBT/PES. Malstat reagens je pripreman rastvaranjem triton-X 100 (0,2%), l-laktata (20 mg/ml), tris pufera (6,6 mg/ml) i APAD (0,11 mg/ml) u dejonizovanoj vodi. NBT/PES rastvor je pripreman rastvaranjem 0,160 g NBT i 0,008 g PES u 100 ml dejonizovane vode. Finalna smeša za bojenje dobijena je mešanjem Malstat reagensa i NBT/PES rastvora u odnosu 5:1. Svi reagensi neophodni za pripremu ovih rastvora nabavljeni su od *Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO)*.

U novu mikrotitarsku ploču razlivano je po 120 μ L smeše za bojenje, a zatim je iz svakog bunara LDH ploče dodato po 20 μ L suspenzije parazita i ispitivanog jedinjenja čime je izazivana reakcija laktat dehidrogenaze.

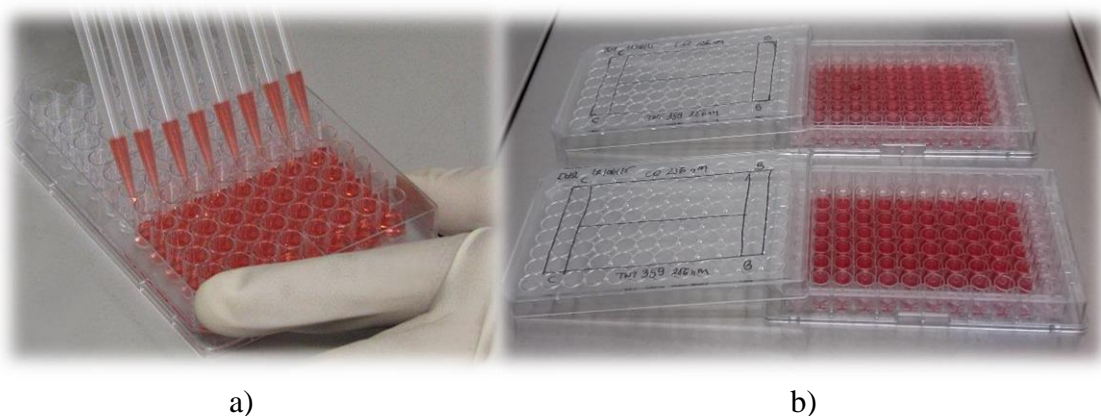
Ploče za bojenje su inkubirane u mraku u trajanju od 1h. Intenzitet razvijene boje u LDH ploči meren je spektrofotometrijski na 620 nm uz pomoć čitača *Multiskan[®] X microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)*, a zatim su izračunate srednje vrednosti optičke gustine (eng. *optical density, OD*) za kontrolu i blank. Vrednost OD za

kontrolu odnosila se na rast parazita bez prisustva jedinjenja (100% rast), a vrednost OD blanka je bila pozadinska aktivnost pLDH.

Aktivnost pLDH koju su oslobodili paraziti u prisustvu određene koncentracije jedinjenja izračunava se prema sledećoj formuli:

$$\frac{\text{ODuzorka} - \text{ODblanka}}{\text{ODkontrola} - \text{ODblanka}} \times 100$$

Dobijena vrednost predstavlja procenat vrednosti rasta parazita uprkos prisustvu jedinjenja (procenat neinhibirane kontrole), i obrnuto je proporcionalna aktivnosti jedinjenja.



Slika 8. LDH esej, (a) izvođenje i (b) izgled eksperimentalnih ploča

3.3.2. ODREĐIVANJE ANTIMALARIJSKE EFIKASNOSTI JEDINJENJA U *in vivo* SISTEMU

3.3.2.1. Kliničko praćenje tretiranih zdravih miševa

Zdravi miševi su tretirani *per os* svim jedinjenjima odabranim za *in vivo* ispitivanja, u dozi od 160 mg/kg/dan (u ukupnom volumenu od 200 μ L) tokom tri uzastopna dana i praćeni tokom 30 dana. Svakodnevno je praćeno preživljavanje miševa, ali i pojava znakova kao što su nakostrešeno krzno, letargija, gubitak apetita, lakrimacija, salivacija, dijareja, konvulzije i gubitak telesne mase. Jedinjenja za koja je kliničkim praćenjem pokazano da ne ispoljavaju nikakve toksične efekte uključena su u dalja ispitivanja.

3.3.2.2. Thompson-ov test

Antimalarijska aktivnost jedinjenja u *in vivo* sistemu je ispitana primenom modifikovane verzije Thompson-ovog testa (Ager, 1984). Test je zasnovan na činjenici da neleženi miševi osetljivog soja (C57BL/6) obavezno umiru posle inokulacije makar i jednog jedinog parazita *P. berghei*. iEr su dobijani iz periferne krvi donorskog miša inficiranog ANKA sojem *P. berghei* (kako je ranije opisano). Infekcija je vršena intraperitonealnom (i.p.) inokulacijom (Slika 10a) 250 µL suspenzije 10⁶ parazita u iEr u PBS-u, i ta vremenska tačka je predstavljala dan 0.

Precizan proračun za pripremu suspenzije parazita pravljen je na osnovu vrednosti parazitemije i broja Er periferne krvi uzorkovane iz repa donorskog miša. Postupak pripreme krvnog razmaza i računanja parazitemije identičan je kao za potrebe *in vitro* eksperimenata i detaljno je opisan u delu 3.2.1.1.1. Er u perifernoj krvi donorskog miša su brojani na standardnom hemocitometru tj. *Bürker-Türk* komori, a željeni broj je računat prema sledećoj formuli:

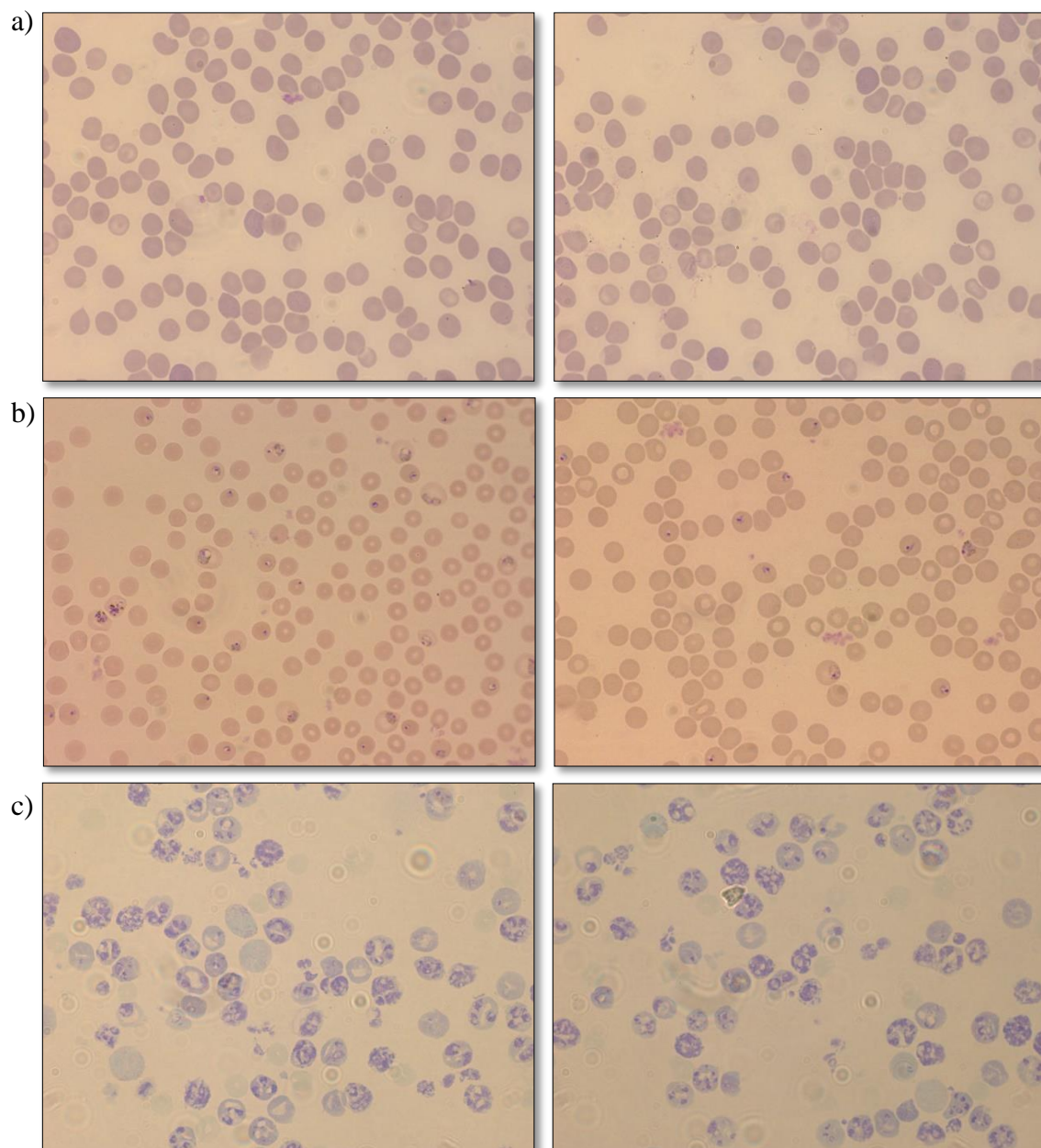
$$X = \frac{\text{prebrojani broj Er}}{(5 \times 0,04) \times 0,1 \times 0,001}$$

Pri čemu je X- broj Er u 1 µL, 5 - broj prebrojanih polja, 0,04 – površina polja u mm², 0,1 - dubina komore u mm, 0,001 - razblaženje uzorkovane krvi u PBS-u

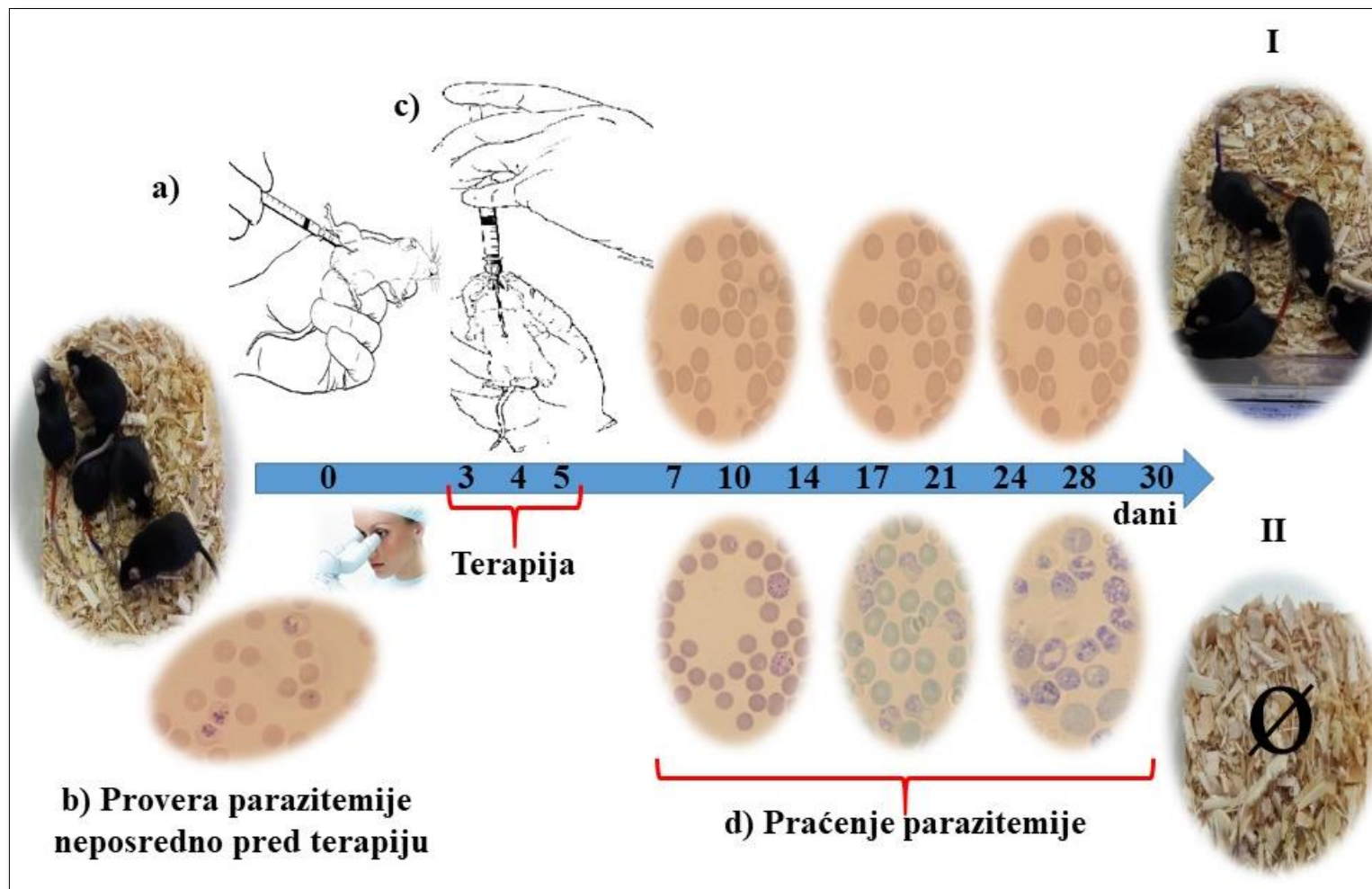
Miševi su tretirani ispitivanim jedinjenjima jednom dnevno tokom tri uzastopna dana (dan 3, 4 i 5 posle infekcije). Jedinjenja su davana *per os* (Slika 10c), i to u skladu sa ranijim iskustvima i naše i drugih grupa (Opsenica i sar., 2011; Sáenz i sar., 2012), u početnoj dozi od 160 mg/kg/dan, koja je, ukoliko pokaže povoljan efekat, dvostruko smanjivana sve do 10 mg/kg/dan. Inficirani miševi tretirani CQ, u istim dozama u kojima se daju eksperimentalna jedinjenja, predstavljali su pozitivnu kontrolnu grupu, dok su neleženi inficirani miševi predstavljali negativnu kontrolnu grupu. Životinje su opservirane tokom 30 dana.

Mikroskopska provera parazitemije u razmazima periferne krvi eksperimentalnih miševa vršena je dva puta nedeljno, počevši od 3. dana posle infekcije (neposredno pred terapiju) pa sve do 30. dana (Slika 10d). Razmazi su pripremani od krvi uzorkovane iz repa eksperimentalnih miševa. Mikroskopirano je do 1000 Er, koji su slikani i brojani, a zatim se pristupalo računanju parazitemije (Slika 9).

Uzorak neposredno pred davanje terapije (Slika 10b) bio je od posebne važnosti, jer je predstavljao dokaz da su životinje zaista bile inficirane u meri koja bi omogućila (mikroskopsko) praćenje efekata terapije. U slučaju da mikroskopskim pregledom razmaza nisu viđeni iEr, životinja je bila isključena iz daljeg eksperimenta.



Slika 9. Reprezentativan prikaz razmaza periferne krvi C57BL/6 miševa inficiranih ANKA sojem *P. berghei* i tretiranih novosintetisanim jedinjenjima: (a) negativan nalaz, (b) pozitivan nalaz i (c) visoko pozitivan nalaz na prisustvo parazita ; bojenje po *Giemsa*-i, svetlosni mikroskop, uveličanje 1000X.

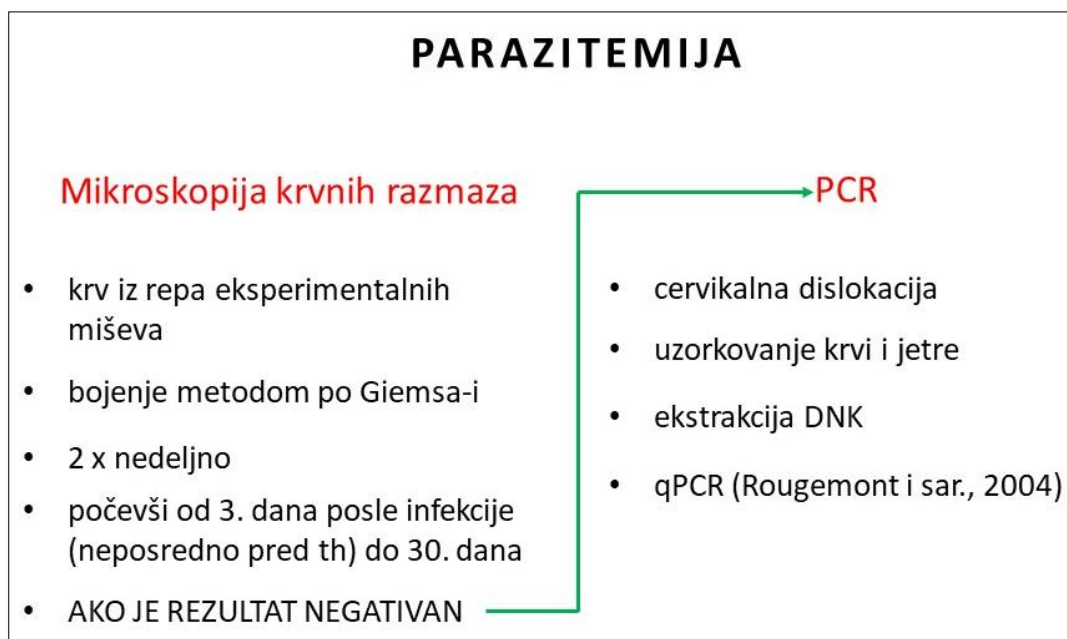


Slika 10. Shematski prikaz modifikovanog *Thompson*-ovog testa. Prikazana su 2 moguća ekstremna ishoda (I - izlječenje; II – letalni ishod)

3.3.2.3. Molekularna dijagnostika

U slučaju mikroskopskih nalaza negativnih na prisustvo *P. berghei*, odnosno postojanja krvnih razmaza u kojima do kraja opservacionog perioda nije bilo mikroskopski vidljivih parazita rađena je i molekularna potvrda prisustva DNK *P. berghei* i to iz uzoraka krvi i tkiva jetre preživelih miševa primenom metode PCR u realnom vremenu (qPCR) (Slika 11).

U odnosu na mikroskopiju, qPCR je osetljivija metoda, pre svega zbog mogućnosti detekcije niskih parazitemija koje mogu biti propuštene mikroskopiranjem. S druge strane, ovom metodom je analizirano 200 μ L uzorka krvi što je višestruko veći volumen u odnosu na volumen uzorkovane krvi korišćene za pravljenje razmaza koji je iznosio svega nekoliko desetina mikrolitara čime se takođe povećava tačnost.



Slika 11. Shematski prikaz praćenja parazitemije

3.3.2.3.1. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK iz krvi i tkiva jetre vršena je komercijalnim kitom, *DNeasy blood and tissue kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Korišćeno je 200 μ L krvi odnosno 100 μ L homogenata jetre. Uzorci krvi lizirani su puferom za liziranje i proteinazom K na 56°C u termomikseru (*Eppendorf Thermomixer 1,5 mL Comfort*, Nemačka) tokom 10 minuta, dok su homogenati jetre inkubirani na isti način do kompletne lize oko 30 min. Zatim je u lizirane uzorke dodavano 200 μ L 96% etanola i sadržaj prebacivan u kolone (*DNeasy Mini spin column*), u kojima se, centrifugovanjem na 8000 obrtaja u toku 1 minuta (*Eppendorf Centrifuge 5415R*, Nemačka), DNK vezivala za membranu. Nakon dva koraka ispiranja radi uklanjanja ćelijskog detritusa sledila su dva koraka elucije u cilju dobijanja maksimalnog prinosa genomske DNK (gDNK). Naposljetku, uzorci su resuspendovani u vodi bez nukleaza ("*nuclease-free*"), tako da je finalni produkt bila gDNK resuspendovana u 100 μ L. Ekstrahovana gDNK je čuvana na -20° do izvođenja qPCR-a.

3.3.2.3.2. qPCR

Detekcija DNK parazita vršena je qPCR-om prema protokolu *Rougemont*-a i sar. za detekciju DNK roda *Plasmodium* gde se kao ciljni gen koristi visoko konzervirani region 18S rRNK gena (Rougemont i sar., 2004). Ovom metodom se korišćenjem odgovarajućih prajmera i visokospecifične probe detektuje segment od 154 bp 18S rRNK gena *P. berghei* (*GenBank accession number M14599*) (Gunderson i sar., 1986). Amplifikacija je vršena na aparatu *StepOne Plus instrument* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD) sa pratećim softverom. Nukleotidne sekvence prajmera i proba su prikazane u Tabeli 6.

Tabela 6. Nukleotidne sekvence prajmera i proba

	Nukleotidna sekvenca
<i>forward</i> prajmer	5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA-3'
<i>reverse</i> prajmer	5'-AACCCAAAGACTTTGATTTTC TCATAA-3'
<i>TaqMan</i> proba	5'-FAM-ACCGTCGTAA TCTTAACCAT AAACTATGCC GACTAG-TAMRA-3'

Analiza svih uzoraka rađena je u triplikatu. Reakciona smeša je sadržala sledeće: 10 µL Maxima Probe qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, SAD), 200 nM rastvora oba prajmera (*forward* i *reverse*), 50 nM *TaqMan* probe (*Invitrogen*, *Life Technologies*, Carlsbad, CA, SAD), 0,5 µL *Uracil-DNA Glycosylase* (UNG), 1 µL MgCl₂, 4 µL vode bez nukleaza i 3 µL uzorka (ekstrahovane gDNK). Finalni volumen reakcione smeše iznosio je 20 µL po uzorku.

Amplifikacija je sprovedena tokom 40 ciklusa na aparatu StepOne Plus (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD) pod sledećim uslovima: 2 minuta na 50°C da bi se omogućilo dejstvo UNG-a, 10 minuta inicijalne denaturacije na 95°C, praćene sa 40 ciklusa smenjivanja denaturacije na 95°C u trajanju od 15 sekundi i vezivanja prajmera i elongacije na 60°C tokom 60 sekundi (Tabela 7). U okviru svakog qPCR programa uključena je negativna kontrola koju je činila voda bez nukleaza, i pozitivna kontrola, koju je činila gDNK *P. berghei*.

Tabela 7. Program za amplifikaciju gena 18S rRNK

Korak	Trajanje	Temperatura	Efekat
1.	2 min	50°	Dejstvo UNG-a
2.	10 min	95°	Inicijalna denaturacija
3.	40 x 15 sek	95°	Denaturacija
4.	40 x 1 min	60°	Vezivanje prajmera i elongacija

Rezultati su smatrani pozitivnim ukoliko je fluorescentni signal rastao iznad praga pozitivnosti (*cycle threshold* - Ct) unutar 40 ciklusa, i obrnuto, ukoliko signal nije detektovan u toku 40 ciklusa, uzorak je smatran negativnim.

3.3.2.4. Parametri efikasnosti jedinjenja u *in vivo* sistemu

Efikasnost novosintetisanih jedinjenja u *in vivo* sistemu određivana je na osnovu dva parametra: stope i dužine preživljavanja (izraženih u % odn. danima) i parazitemije (%) tretiranih životinja u periodu od 30 dana posle infekcije. Životinja živa 31. dana sa dokazanim klirensom parazita iz periferne krvi smatrana je izlečenom.

3.4. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Statistička analiza dobijenih rezultata vršena je korišćenjem softvera *GraphPad Prism* v. 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Analiza rezultata testova izvođenih u *in vitro* sistemu obuhvatala je određivanje srednje (na nivou 50% aktivnosti) vrednosti inhibitorne koncentracije (IC_{50}) prema modelu sigmoidne krive dozno zavisnog odgovora promenljivog nagiba (*sigmoidal dose-response with variable slope*). Koncentracije ispitivanih jedinjenja izražene su kao logaritamske vrednosti, a koncentracija koja uzrokuje odgovor na polovini (puta) između bazalnog (*bottom*) i maksimalnog (*top*) odgovora jeste IC_{50} . Softver za svako ispitivano jedinjenje u statističkoj tabeli rezultata daje i vrednost IC_{50} . Treba napomenuti da vrednost IC_{50} ne odgovara efektu za vrednost $Y=50\%$, već je zavisna od jedinica u kojima je eksprimiran “Y” kao i vrednosti za bazalni odn. maksimalni odgovor. Pomenuti model podrazumeva promenljivi nagib/koefficient krive ($k \neq 1$), a pošto se izračunava iz četiri parametra naziva se i četvoroparametarska logistička kriva (*four-parameter logistic curve*; 4PL).

Rezultati testova izvođenih u *in vivo* uslovima izraženih kao stope preživljavanja u svakoj grupi životinja tretiranih određenom dozom ispitivanog jedinjenja podvrgnuti su *survival* analizama, i to Kaplan-Majer (*Kaplan-Meier*) *product limit* metodom. Dobijene krive preživljavanja međusobno su poređene neparametarskim testovima, i to *log-rank* testom kod poređenja dve krive i *log-rank testom za trendove* kod poređenja više od dve krive.

Statistička značajnost za sve metode računata je na nivou 0,05.

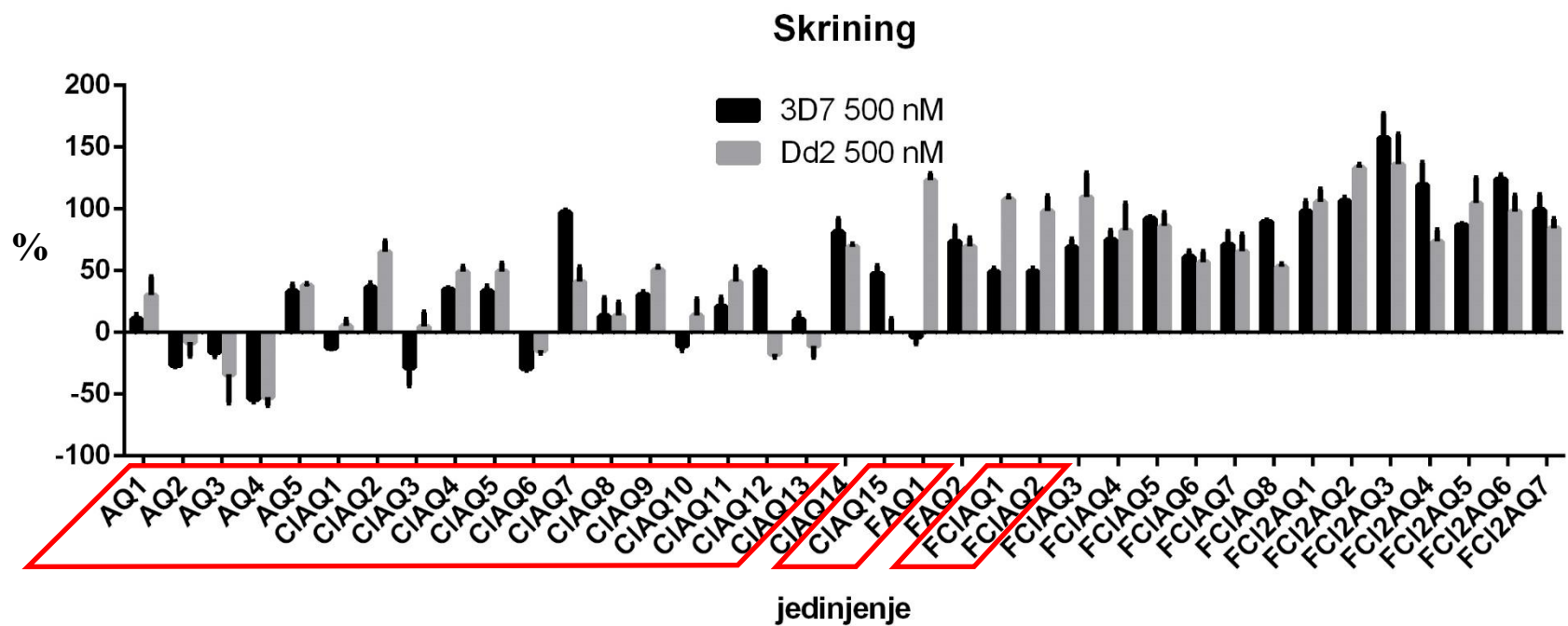
4. REZULTATI

Rezultati ovog istraživanja odnose se na antimalarijsku aktivnost 37 novosintetisanih aminohinolina ispoljenu u opsežnim ispitivanjima u *in vitro* (LDH esej) i *in vivo* (*Thompson*-ov test) model sistemima.

4.1. ANTIMALARIJSKI POTENCIJAL NOVOSINTETISANIH AMINOHINOLINA ISPITAN U *in vitro* MODEL SISTEMU (LDH ESEJ)

4.1.1. ANTIMALARIJSKA AKTIVNOST JEDINJENJA U *in vitro* MODEL SISTEMU - SKRINING FAZA

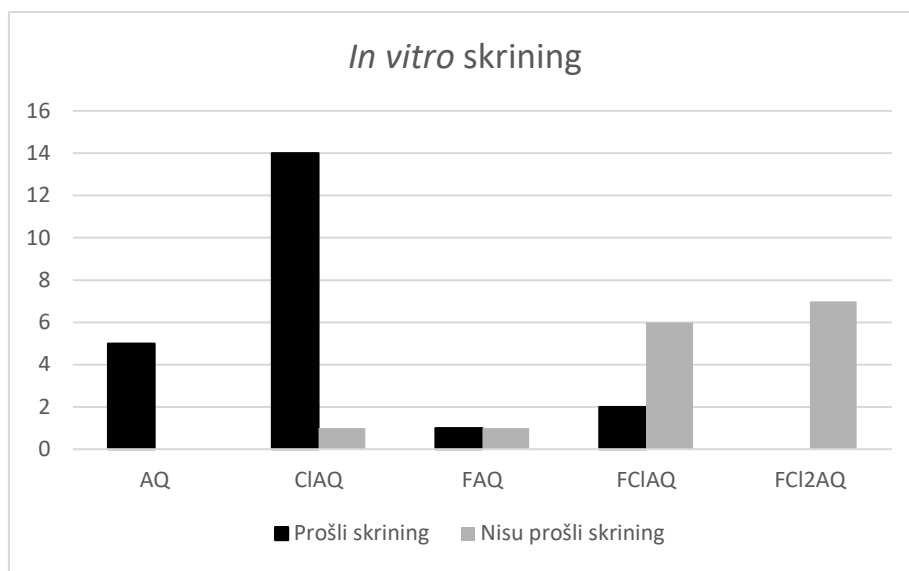
Ispitivanja antimalarijskog potencijala novosintetisanih aminohinolina u *in vitro* model sistemu započeta su tzv. skrining fazom, u kojoj je određivana aktivnost svih 37 jedinjenja primenjenih u istoj koncentraciji (500 nM) prema oba soja *P. falciparum* (CQ^S i CQ^R). Cilj skrininga je bio da se odrede jedinjenja koja inhibišu rast bar 50% parazita makar jednog od ispitivanih sojeva *P. falciparum*. Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da je skoro 60% (59,5%) jedinjenja primenjenih u definisanoj koncentraciji vršilo $\geq 50\%$ inhibicije rasta parazita bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum*. Naime, od 37 ispitivanih jedinjenja, 17 je ispunilo zadati uslov prema oba soja *P. falciparum* (AQ1-AQ5, CIAQ1, CIAQ3-CIAQ6, CIAQ8-CIAQ13, CIAQ15), četiri su ispoljila aktivnost samo prema soju 3D7 (CIAQ2, FAQ1, FCIAQ1, FCIAQ2) a jedno jedinjenje samo prema Dd2 soju (CIAQ7). S druge strane, 15 jedinjenja (CIAQ14, FAQ2, FCIAQ3-FCIAQ8, FC12AQ1-FC12AQ7) koja nisu vršila $\geq 50\%$ inhibicije rasta nijednog od dva ispitivana soja *P. falciparum* isključena su iz daljih istraživanja (Grafikon 1).



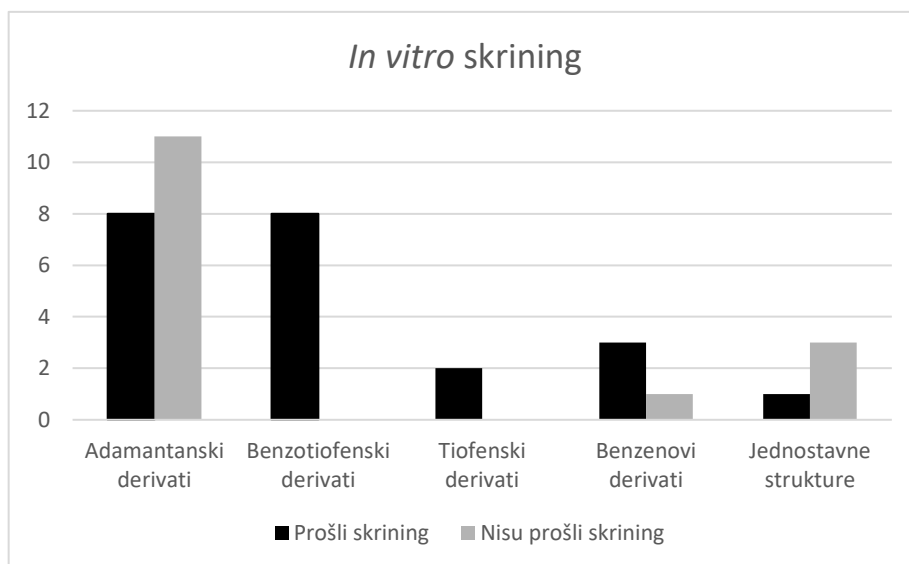
Grafikon 1. *In vitro* aktivnost 37 novosintetisanih jedinjenja prema dva soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2)

*crvenim okvirom označena jedinjenja koja su u koncentraciji 500 nM inhibirala rast $\geq 50\%$ parazita bar jednog od dva soja

Isti rezultati prikazani su na Grafikonu 2 po grupama jedinjenja formiranim na osnovu strukturalnih modifikacija na aminohinolinskom jezgru (AQ, CIAQ, FAQ, FCIAQ, FC12AQ), a na Grafikonu 3 prema podeli na osnovu struktura u bočnom lancu aminohinolinskog prstena (adamantan, benzotiofen, tiofen, benzen, jednostavna struktura).



Grafikon 2. Rezultati *in vitro* skrininga jedinjenja grupisanih na osnovu strukturalnih modifikacija na aminohinolinskom jezgru



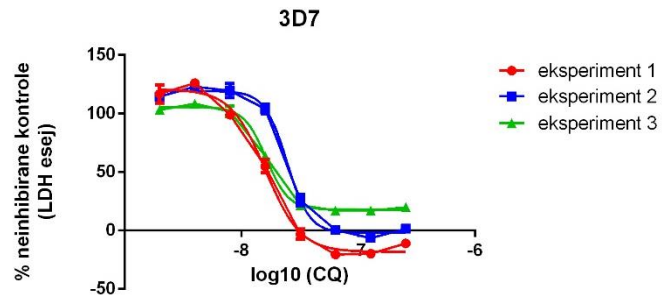
Grafikon 3. Rezultati *in vitro* skrininga jedinjenja grupisanih na osnovu strukturalne modifikacije u bočnom lancu aminohinolina

4.1.2. ANTIMALARIJSKA AKTIVNOST JEDINJENJA U *in vitro* MODEL SISTEMU - FAZA ODREĐIVANJA IC₅₀ VREDNOSTI

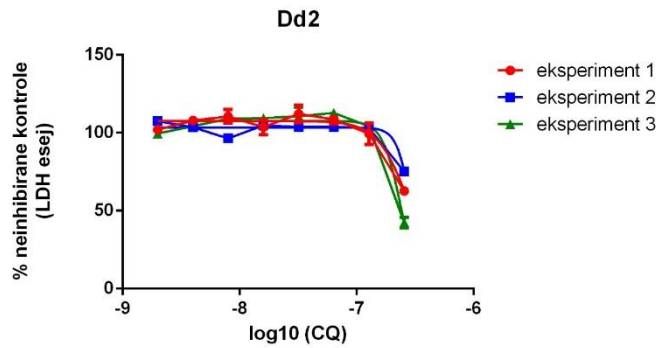
U daljem radu bliže je ispitana antimalarijska aktivnost 22 jedinjenja koja su vršila $\geq 50\%$ inhibicije rasta parazita bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum* u eksperimentima tipa doza-odgovor. U cilju određivanja IC₅₀ vrednosti za sva jedinjenja, u istom model sistemu je svako pojedinačno jedinjenje ispitano u osam koncentracija dobijenih dvostrukim razblaživanjem počev od koncentracije od 256 nM ili 1000 nM (zavisno od rezultata u skrining fazi). Aktivnost za sva jedinjenja ispitana je prema oba soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2), osim onih za koja je u skrining fazi pokazana aktivnost prema samo jednom soju, za koja je i IC₅₀ ispitivan samo prema ovome soju. Eksperiment je za svako jedinjenje urađen tri puta, sa po tri ponovka u okviru pojedinačnog eksperimenta. IC₅₀ vrednosti za CQ su korišćene kao pozitivna kontrola.

Dobijeni rezultati doza-odgovor eksperimenata prikazani su na panelu Grafikona 4 (A-W), pri čemu svaki pojedinačni grafik prikazuje rezultate sva tri eksperimenta izvedena za jedno jedinjenje prema jednom parazitskom soju. Za 17 jedinjenja prikazana je antimalarijska aktivnost prema oba soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2), dok je za pet jedinjenja efekat prema jednom od dva ispitivana soja izostao (IC₅₀>500 nM), tako da je aktivnost prikazana samo za po jedan soj. Kompletni statistički podaci su dati samo za kontrolno jedinjenje (Grafikon 4A), kao ilustracija.

A)

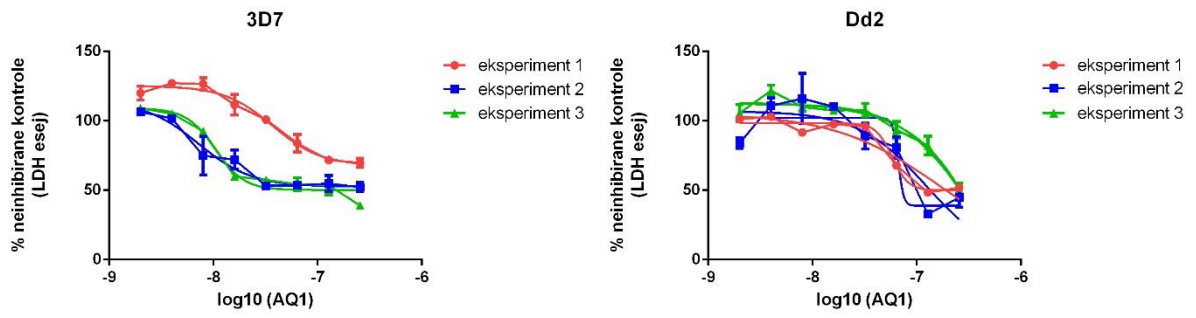


	eksperimen 1	eksperimen 2	eksperimen 3
Sigmoidal dose-response (variable slope)			
Best-fit values			
Bottom	-18.35	-2.137	17.81
Top	120.7	119.1	105.5
LogEC50	-7.792	-7.610	-7.788
HillSlope	-2.903	-4.540	-4.564
EC50	1.614e-008	2.457e-008	1.631e-008
Std. Error			
Bottom	3.083	2.113	1.349
Top	3.854	2.094	1.578
LogEC50	0.02312	0.01602	0.01138
HillSlope	0.4301	0.4960	0.8435
95% Confidence Intervals			
Bottom	-24.78 to -11.92	-6.545 to 2.271	15.00 to 20.62
Top	112.6 to 128.7	114.8 to 123.5	102.2 to 108.8
LogEC50	-7.840 to -7.744	-7.643 to -7.576	-7.811 to -7.764
HillSlope	-3.800 to -2.005	-5.575 to -3.506	-6.324 to -2.805
EC50	1.444e-008 to 1.804e-008	2.275e-008 to 2.653e-008	1.544e-008 to 1.723e-008

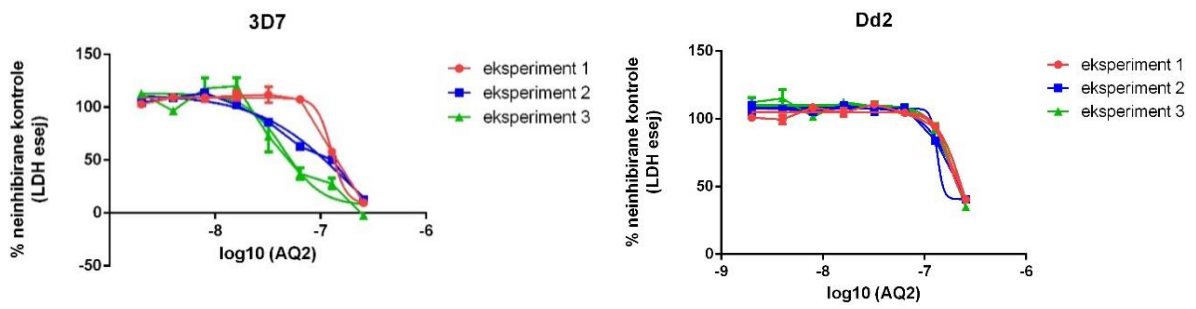


	eksperimen 1	eksperimen 2	eksperimen 3
Sigmoidal dose-response (variable slope)			
Best-fit values			
Bottom	= 0.0	= 0.0	= 0.0
Top	107.4	103.2	107.5
LogEC50	-6.546	-6.530	-6.626
HillSlope	-3.252	-6.953	-5.642
EC50	2.834e-007	2.949e-007	2.370e-007
Std. Error			
Top	1.763	0.8528	1.411
LogEC50	0.02658	0.09234	0.01416
HillSlope	0.9293	10.49	1.713
95% Confidence Intervals			
Top	103.8 to 111.1	101.4 to 105.0	104.6 to 110.5
LogEC50	-6.603 to -6.492	-6.722 to -6.338	-6.655 to -6.596
HillSlope	-5.185 to -1.318	-28.78 to 14.87	-9.206 to -2.079
EC50	2.495e-007 to 3.218e-007	1.895e-007 to 4.589e-007	2.215e-007 to 2.537e-007

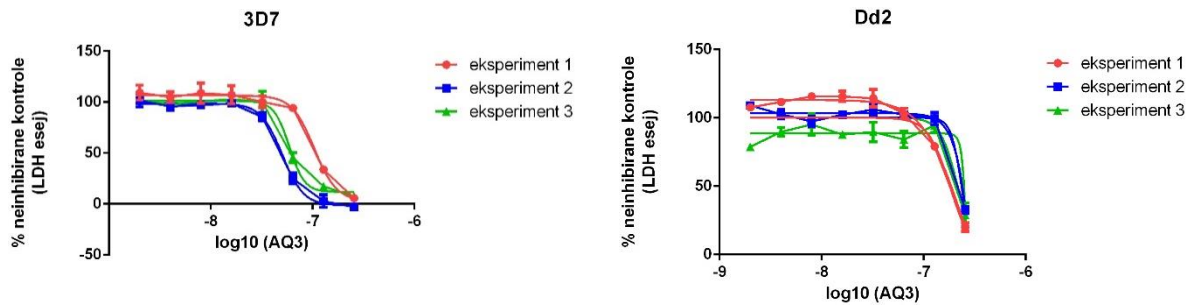
B)



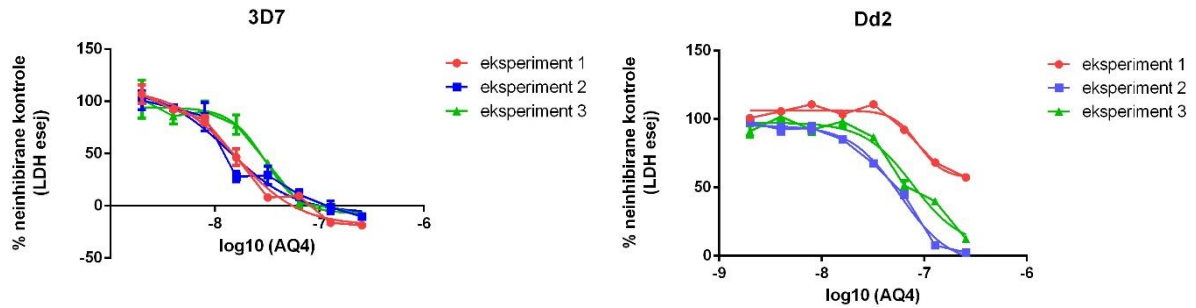
C)



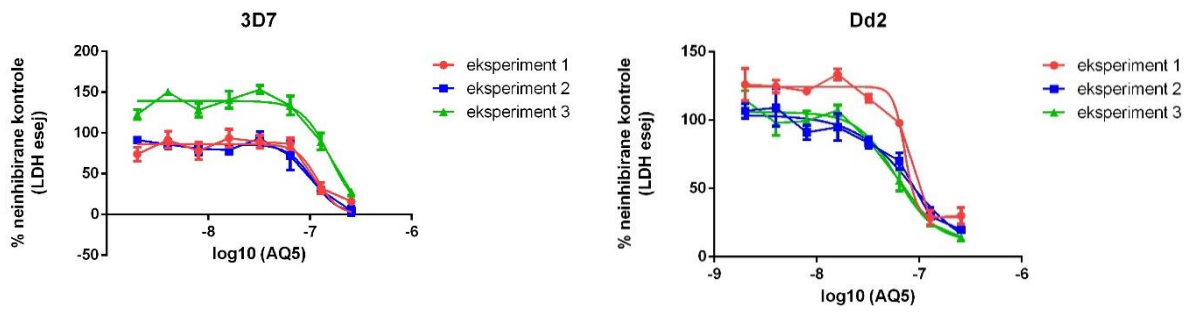
D)



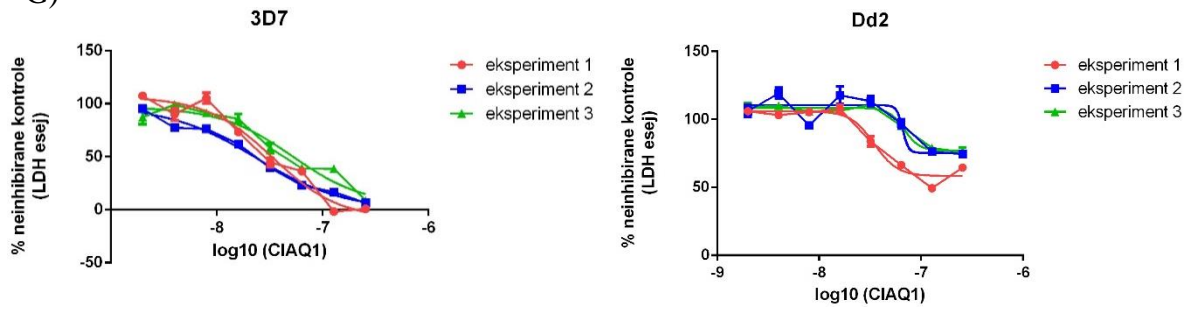
E)



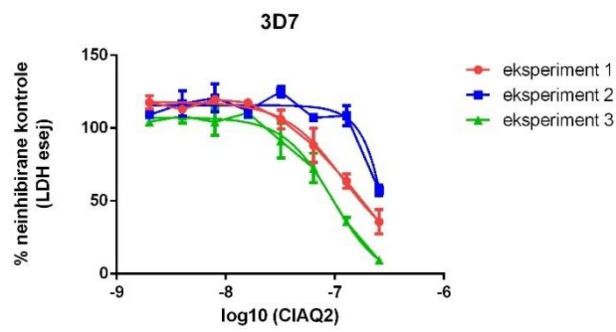
F)



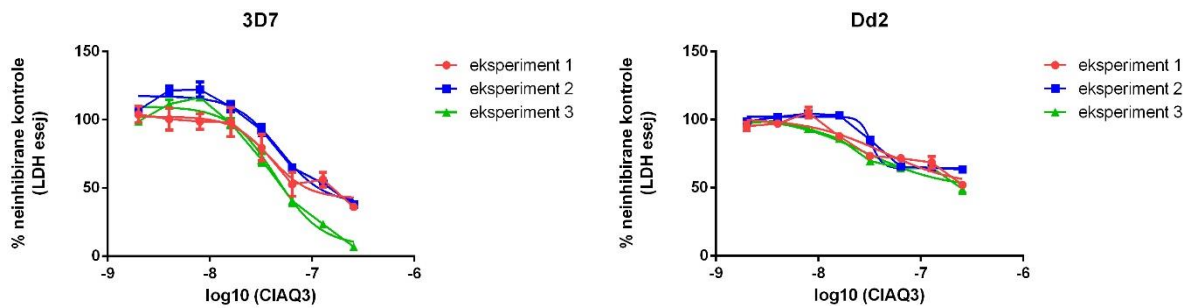
G)



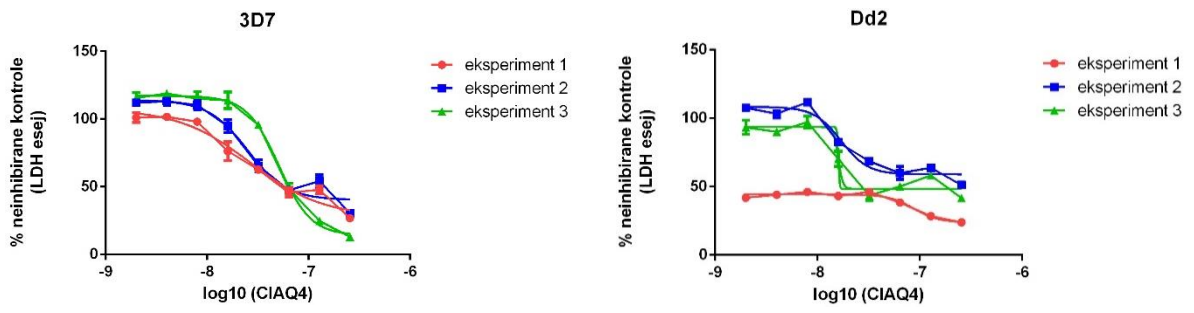
H)



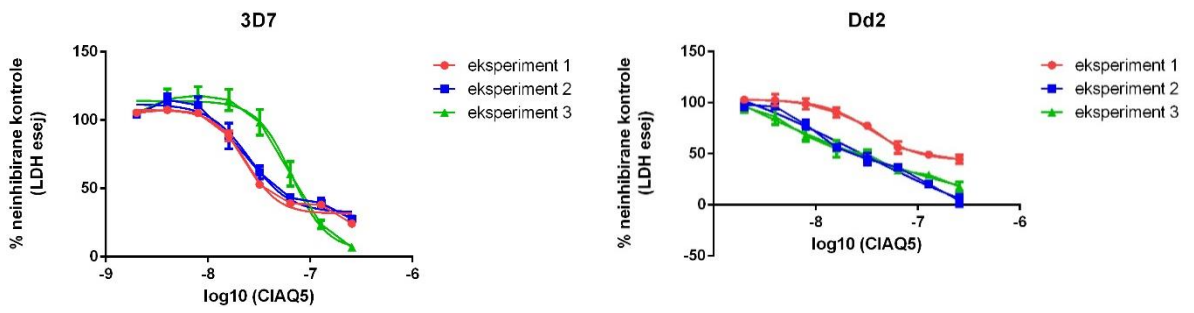
I)



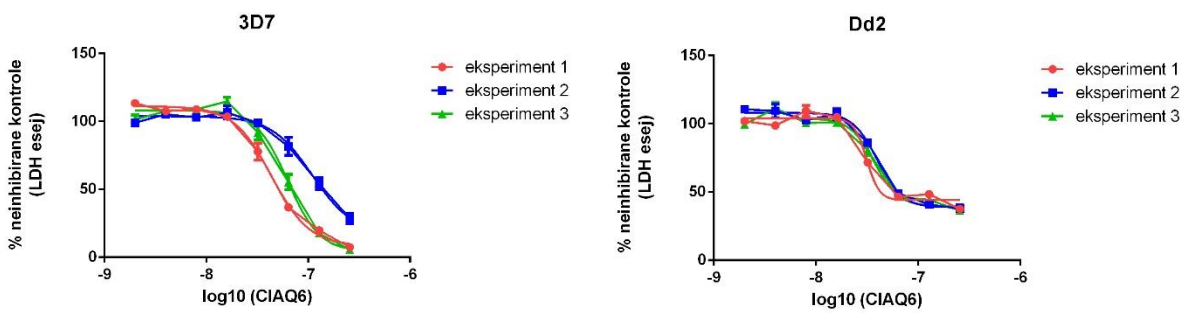
J)



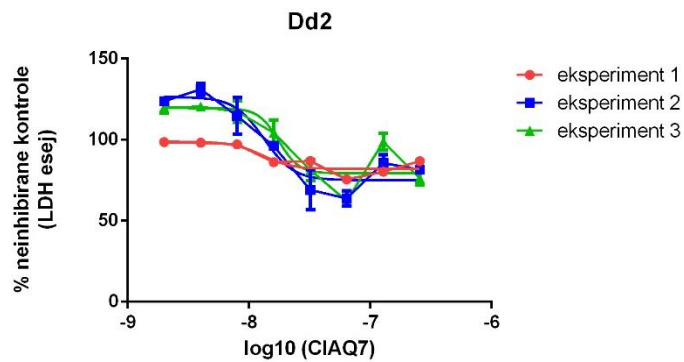
K)



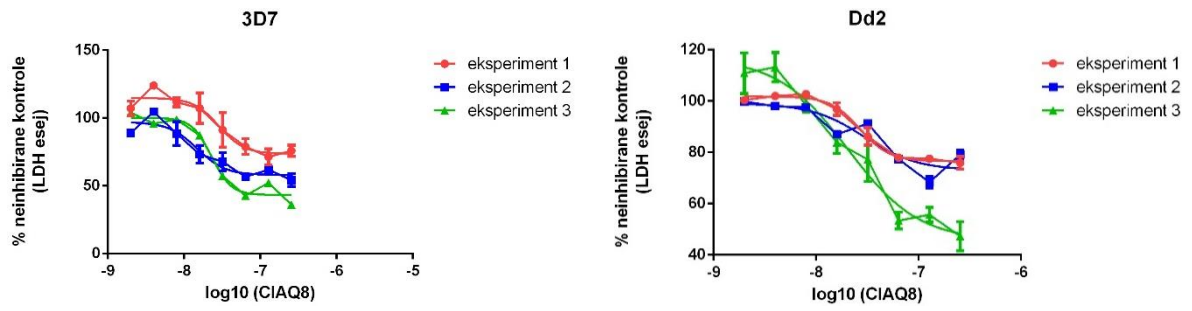
L)



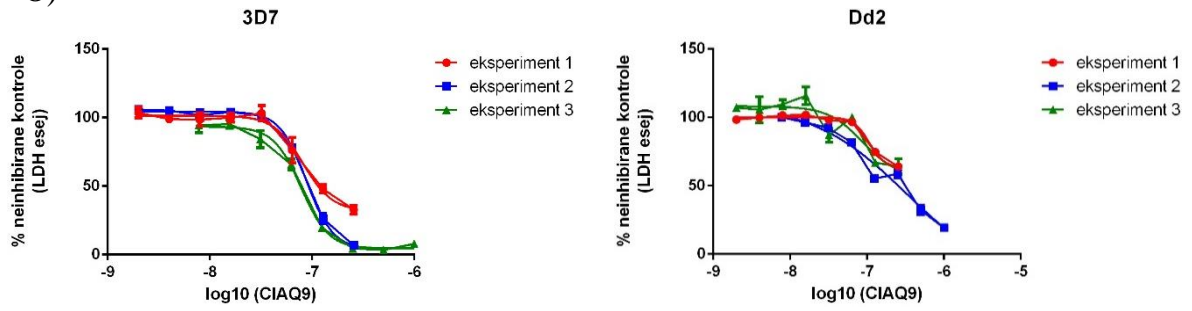
M)



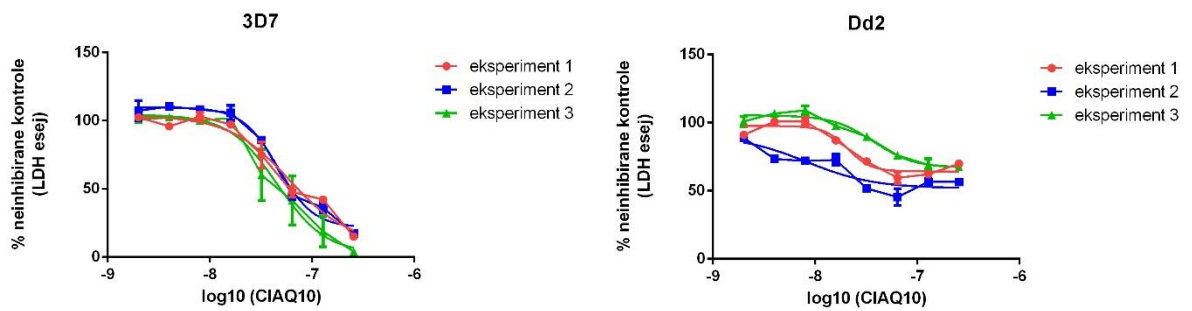
N)



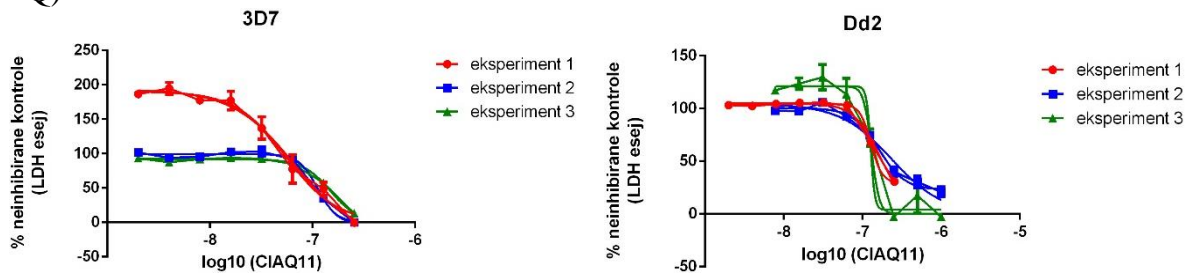
O)



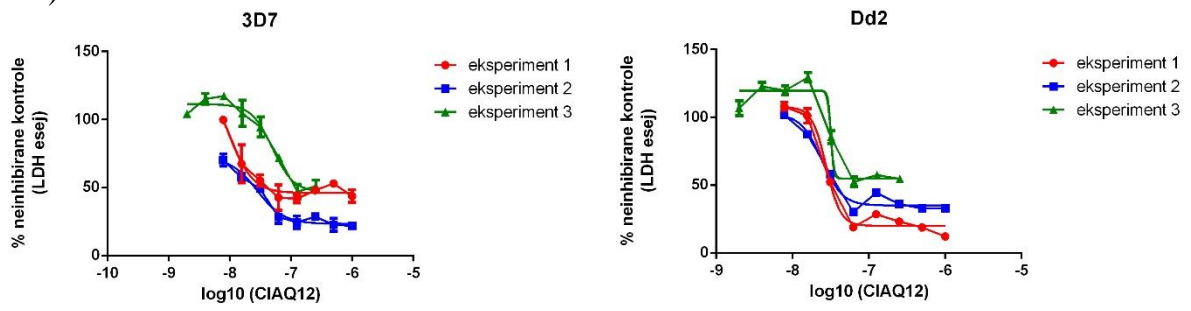
P)



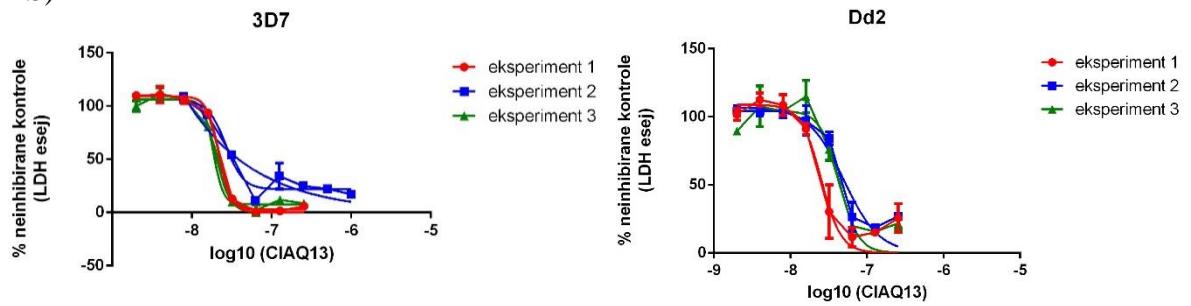
Q)



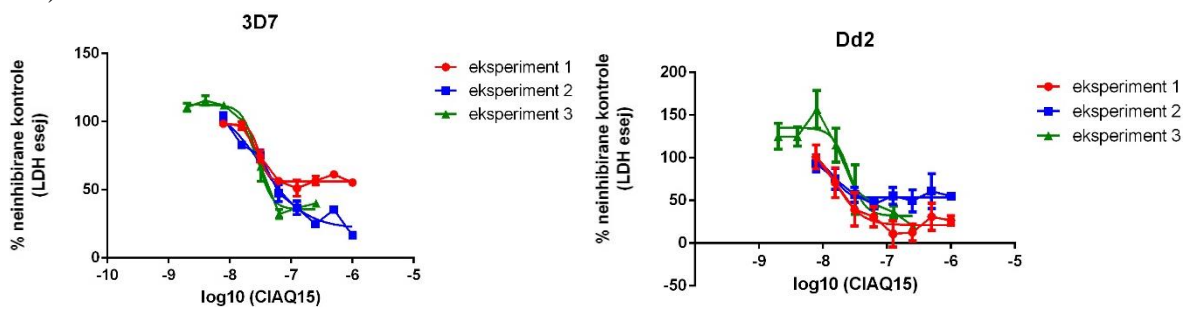
R)



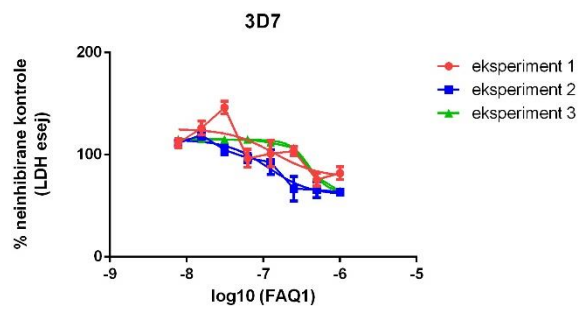
S)



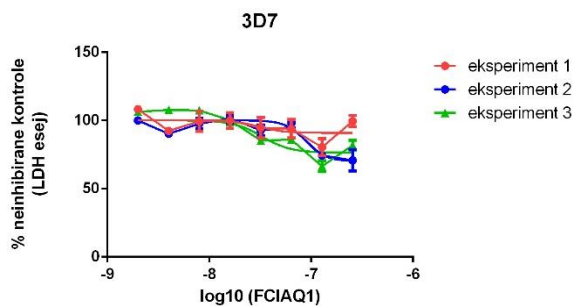
T)



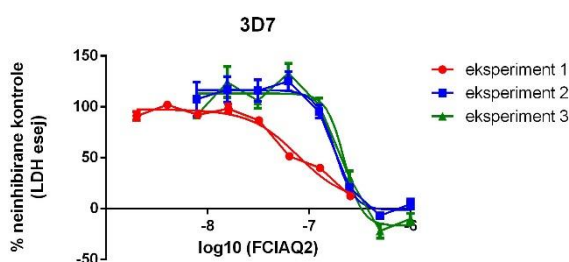
U)



V)



W)



Grafikon 4. Zavisnost vijabilnosti parazita *P. falciparum* soja 3D7 i/ili Dd2 od primenjene koncentracije kontrolnog (A), i ispitivanih jedinjenja: B) AQ1; C) AQ2; D) AQ3; E) AQ4; F) AQ5; G) CIAQ1; H) CIAQ2; I) CIAQ3; J) CIAQ4; K) CIAQ5; L) CIAQ6; M) CIAQ7; N) CIAQ8; O) CIAQ9; P) CIAQ10; Q) CIAQ11; R) CIAQ12; S) CIAQ13; T) CIAQ15; U) FAQ1; V) FCIQA1; W) FCIQA2. Rezultat (kriva doza-odgovor) svakog pojedinačnog eksperimenta (1, 2, 3) predstavljen je različitom bojom (crvenom, plavom, zelenom).

IC₅₀ vrednosti su računane u statističkom programu u kome su dobijeni rezultati obrađivani. Po tri IC₅₀ vrednosti iz tri različita eksperimenta za jedan ili oba soja *P. falciparum* (3D7 i/ili Dd2) za sva ispitana jedinjenja i kontrolni CQ prikazane su u Tabeli 8.

Tabela 8. Antimalarijska aktivnost novosintetisanih jedinjenja i kontrolnog jedinjenja CQ prema oba soja *P. falciparum*

Grupa	Jedinjenje	Soj 3D7 (CQ ^S)			Soj Dd2 (CQ ^R)		
		IC ₅₀ nM					
		Eksperiment			Eksperiment		
		1	2	3	1	2	3
AQ	AQ1	37,09	7,20	10,44	58,08	122,3	232,5
	AQ2	127,3	174,4	44,86	171,7	210,2	206,3
	AQ3	103,6	50,23	58,95	221,8	224,3	214,8
	AQ4	16,14	13,55	30,26	87,39	58,32	77,44
	AQ5	118	106	158,3	72,38	84,17	60,05
CIAQ	CIAQ1	34,01	23,73	51,98	34,64	84,30	68,25
	CIAQ2	119	255,3	95,64	>500	>500	>500
	CIAQ3	39,03	47,99	43,88	44,05	32,8	29,1
	CIAQ4	26,92	25,01	51,11	87,39	16,98	1,746
	CIAQ5	23,6	25,49	66,07	34,95	26,39	5,016
	CIAQ6	43,8	109,5	62,92	31,31	39,73	37,17
	CIAQ7	>500	>500	>500	12,87	13,28	17,58
	CIAQ8	28,61	14,87	22,94	26,93	29,67	20,57
	CIAQ9	81,51	87,79	78,05	106,8	326,7	87,61
	CIAQ10	59,88	46,47	45,55	20,83	8,24	37,33
	CIAQ11	55,1	112	149,1	172,3	234,4	130,7
	CIAQ12	9,45	28,18	49,84	27,71	24,23	101,3
	CIAQ13	21,69	26,61	18,58	25,13	49,88	43,68
	CIAQ15	30,01	32,62	27,89	16,33	16	25,49
	FAQ	FAQ1	138,8	115,3	398,1	>500	>500
FCIAQ	FCIAQ1	31	88,21	25,44	>500	>500	>500
	FCIAQ2	77,44	178,6	221,8	>500	>500	>500
Kontrola	CQ	16,14	24,57	16,31	283,4	294,9	237

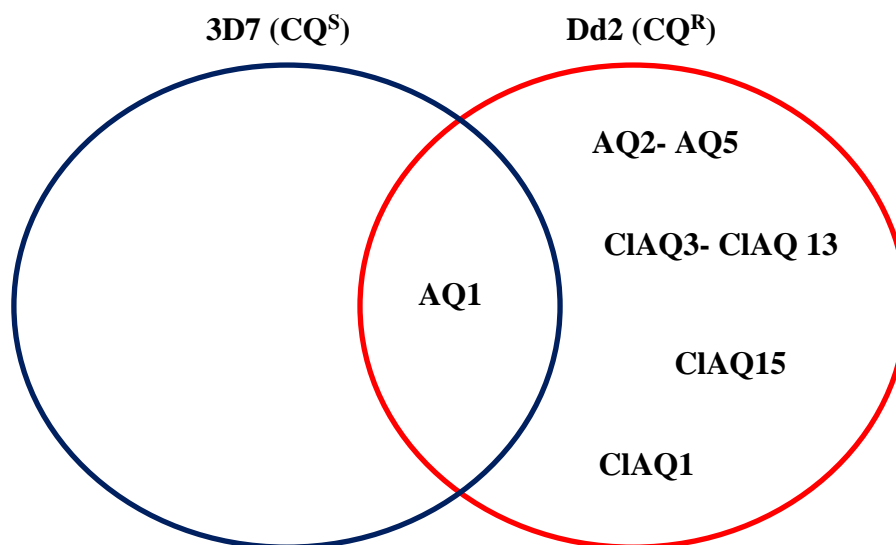
IC₅₀ vrednost svakog od ispitivanih jedinjenja izračunata je kao geometrijska sredina IC₅₀ vrednosti pojedinačnih eksperimenata za određeni soj *P. falciparum* i u daljoj analizi služi za poređenje antimalarijske aktivnosti novosintetisanih jedinjenja i CQ (Tabela 9).

Tabela 9. IC₅₀ (nM) vrednosti za ispitivana jedinjenja i CQ prema oba soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2)

Grupa	Jedinjenje	IC ₅₀ (nM)	
		3D7 (CQ ^S)	Dd2 (CQ ^R)
AQ	AQ1	14,08	118,2
	AQ2	99,86	195,3
	AQ3	67,33	223
	AQ4	18,77	73,35
	AQ5	125,57	71,52
CIAQ	CIAQ1	34,75	58,4
	CIAQ2	142,7	>500
	CIAQ3	43,48	34,8
	CIAQ4	32,53	13,7
	CIAQ5	34,13	16,7
	CIAQ6	67,07	35,9
	CIAQ7	>500	14,43
	CIAQ8	21,37	25,43
	CIAQ9	82,35	186,8
	CIAQ10	50,23	18,6
	CIAQ11	97,26	174,12
	CIAQ12	23,7	40,82
	CIAQ13	22,05	37,97
	CIAQ15	30,11	18,81
	FAQ	FAQ1	185,38
FCIAQ	FCIAQ1	41,13	>500
	FCIAQ2	145,36	>500
Kontrola	CQ	18,63	270,57

4.1.3. ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA AKTIVNOSTI JEDINJENJA U *in vitro* MODEL SISTEMU

Poređenje IC₅₀ vrednosti antimalarijske aktivnosti 22 ispitana jedinjenja i CQ pokazalo je da je čak 18 jedinjenja ispoljilo bolju aktivnost (nižu IC₅₀ vrednost) u odnosu na kontrolno jedinjenje prema soju Dd2 (CQ^R), a samo jedno jedinjenje je imalo bolju aktivnost i prema soju 3D7 (CQ^S) (Grafikon 5). Ovaj neočekivani rezultat da je veliki broj ispitanih jedinjenja aktivnije prema rezistentnom soju od izuzetne je vrednosti, jer je osnovni cilj unapređenja terapije malarije upravo prevazilaženje parazitske rezistencije na postojeće antimalarike. Preostala četiri jedinjenja nisu pokazala bolju antimalarijsku aktivnost od kontrole ni prema jednom soju *P. falciparum*.



Grafikon 5. Prikaz 18 jedinjenja aktivnijih prema jednom/oba ispitivana soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2) u odnosu na kontrolno jedinjenje (CQ)

Prikazana opsežna ispitivanja aktivnosti novosintetisanih aminohinolina u odabranom *in vitro* model sistemu pokazala su da je 18 jedinjenja ispoljilo aktivnost višu od CQ prema bar jednom od dva soja *P. falciparum*, čime se svih 18 kvalifikovalo za dalja ispitivanja u *in vivo* modelu (među njima samo jedno - AQ1 - koje je bilo aktivnije prema oba ispitivana soja *P. falciparum*). Međutim, tri jedinjenja (AQ4, CIAQ10, CIAQ12) iz tehničkih razloga (nisu sintetisana u dovoljnoj količini) nisu bila dostupna za ovaj deo ispitivanja. S druge strane, u cilju provere korelacije rezultata dobijenih na osnovu ispitivanja aktivnosti u *in vitro* i *in vivo* model sistemima, u eksperimente na životinjama uključena su i sva četiri jedinjenja koja nisu bila aktivnija od CQ ni na jednom soju parazita (CIAQ2, FAQ1, FCIAQ1, FCIAQ2). Otuda je u ispitivanja u *in vivo* model sistemu uključeno ukupno 19 jedinjenja (AQ1-AQ3, AQ5, CIAQ1-CIAQ9, CIAQ11, CIAQ13, CIAQ15, FAQ1, FCIAQ1, FCIAQ2) (Tabela 10).

Tabela 10. Jedinjenja čija je antimalarijska aktivnost ispitivana u *in vivo* model sistemu

Grupa	Jedinjenje	Toksičnost 160 mg/kg/dan	Terapijska doza (mg/kg/dan)			
			160 i/ili 80	160	80	40, 20, 10
AQ	AQ1		+		+	
	AQ2	+				
	AQ3	+				
	AQ5*					
CIAQ	CIAQ1		+	+	+	+
	CIAQ2		+		+	
	CIAQ3	+**	+		+	
	CIAQ4		+	+	+	
	CIAQ5		+	+		
	CIAQ6	+				
	CIAQ7		+	+		
	CIAQ8		+	+		
	CIAQ9		+	+		
	CIAQ11		+	+		
	CIAQ13		+	+	+	
	CIAQ15		+	+	+	
FAQ	FAQ1		+		+	
FCIAQ	FCIAQ1		+	+	+	+
	FCIAQ2		+	+		
Ukupno (br. jedinjenja)	19	4	15	11	9	2

* netoksičan u dozi od 160 mg/kg/dan, ali nedostupan za dalja ispitivanja

** strukturna sličnost sa ostalim netoksičim benzotiofenskim članovima CIAQ grupe

4.2. ANTIMALARIJSKI POTENCIJAL NOVOSINTETISANIH AMINOHINOLINA U *in vivo* MODEL SISTEMU (*Thompson-OV TEST*)

4.2.1. KLINIČKO PRAĆENJE ZDRAVIH MIŠEVA TRETIRANIH ISPITIVANIM JEDINJENJIMA

Ispitivanja novosintetisanih jedinjenja u *in vivo* modelu započeta su ispitivanjem grube toksičnosti na zdravim miševima, i to tako što je svih 19 jedinjenja primenjeno u dozi od 160 mg/kg/dan na zdravim miševima. Na osnovu kliničkog praćenja tretiranih miševa utvrđeno je da četiri jedinjenja (21%, 4/19) ispoljavaju efekte akutne toksičnosti što ih je diskvalifikovalo iz daljih ispitivanja. Kod eksperimentalnih životinja tretiranih jedinjenjima AQ2, AQ3, CIAQ3 i CIAQ6 primećena je letargičnost i gubitak apetita. Ishod je bio letalan za 100% (5/5) životinja tretiranih jedinjenjima AQ2, AQ3 i CIAQ3, dok je u slučaju jedinjenja CIAQ6 letalan ishod bio kod 60% (3/5) životinja. Da je u pitanju akutna toksičnost zaključeno je na osnovu toga što su tretirane životinje uginule već posle prve od ukupno tri primljene doze. Naime, svih pet životinja tretiranih jedinjenjem AQ3 uginulo je nakon prve doze, dok su među životinjama tretiranim jedinjenjem CIAQ6 dve uginule nakon primljene prve doze, a još jedna nakon treće. Dinamika uginjavanja miševa tretiranih jedinjenjima AQ2 i CIAQ3 bila je identična: nakon prve i druge doze redom uginjavale su po dve životinje, dok je nakon treće doze uginuo i peti (poslednji) miš.

Na osnovu navedenih rezultata, iz daljeg rada isključena su tri jedinjenja (AQ2, AQ3 i CIAQ6) sa adamantanskim prstenom. Međutim, kako jedinjenje CIAQ3 ima značajnu strukturnu sličnost sa svim ostalim benzotiofenskim članovima CIAQ grupe, od kojih nijedno nije ispoljilo toksičnost, ispitano je na toksičnost i u dvostruko nižoj dozi (80 mg/kg/dan), u kojoj se pokazalo netoksičnim, i otuda je uključeno u dalje eksperimente (počev od te doze). S druge strane, ispostavilo se da ni jedinjenje AQ5, iako netoksično, nije bilo dostupno za ispitivanje aktivnosti u *in vivo* sistemu.

4.2.2. ANTIMALARIJSKA AKTIVNOST JEDINJENJA ISPITANA U *in vivo* MODEL SISTEMU

Za ispitivanja antimalarijske efikasnosti u *in vivo* model sistemu je odabrano ukupno 15 (40,5%, 15/37) jedinjenja (AQ1, CIAQ1-CIAQ5, CIAQ7-CIAQ9, CIAQ11, CIAQ13, CIAQ15, FAQ1, FCIAQ1, FCIAQ2).

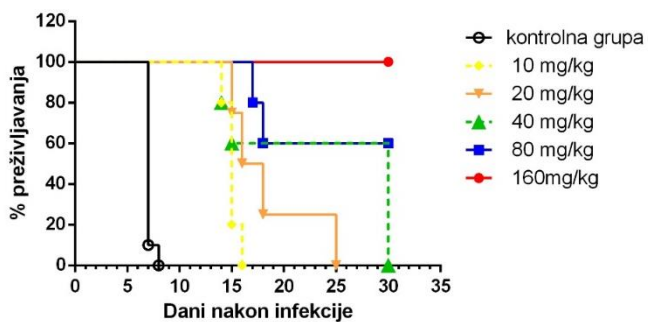
Detaljno ispitivanje aktivnosti u *in vivo* sistemu vršeno je tretiranjem miševa inficiranih ANKA sojem *P. berghei* odabranim jedinjenjima u dozi od 80 mg/kg/dan i/ili 160 mg/kg/dan a u slučaju pozitivnog efekta naknadno je ispitana efikasnost jedinjenja tretiranjem životinja i nižim dozama (10 mg/kg/dan, 20 mg/kg/dan i 40 mg/kg/dan).

Antimalarijska aktivnost ispitivanih aminohinolina određena je praćenjem stope i dužine preživljavanja i parazitemije inficiranih životinja tretiranih definisanim dozama jedinjenja kao parametrima efikasnosti tretmana.

4.2.2.1. Stopa i dužina preživljavanja

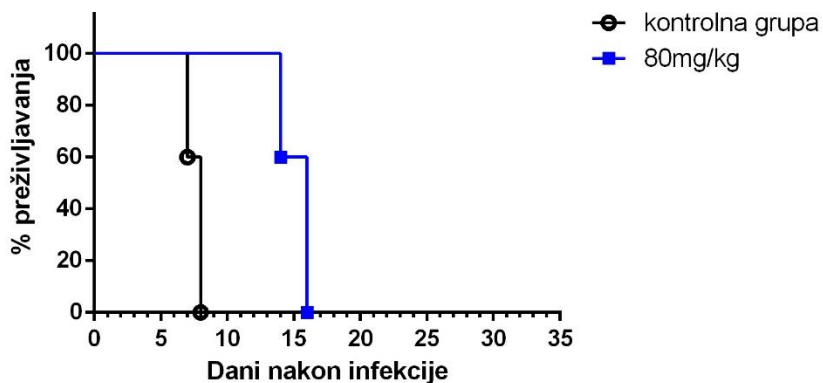
Stopa i dužina preživljavanja miševa inficiranih parazitom *P. berghei* koji su tretirane kontrolnim (CQ) i novosintetisanim jedinjenjima (15 aminohinolina) zajedno sa statističkom analizom prikazani su na panelu Grafikona 6 (A-P). Rezultati tretiranja životinja različitim dozama istog jedinjenja predstavljeni su u okviru jednog grafik(on)a. Kompletni statistički podaci dati su kao ilustracija, i to i za slučaj poređenja dve (AQ1), i za slučaj poređenja više od dve krive preživljavanja (CQ).

A) CQ



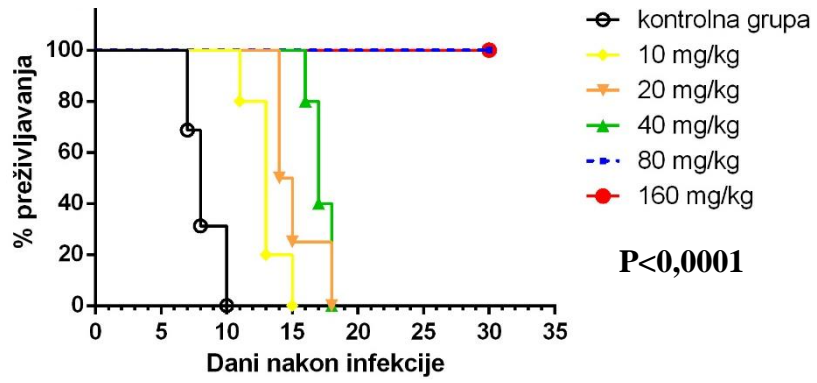
Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) test (recommended)	
Chi square	50.60
df	5
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are the survival curves sig different?	Yes
Logrank test for trend (recommended)	
Chi square	40.78
df	1
P value	< 0.0001
P value summary	****
Sig. trend?	Yes

B) AQ1

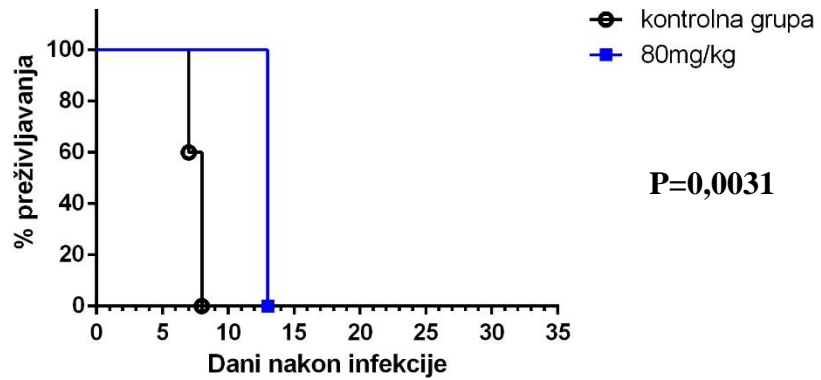


Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	8.731
df	1
P value	0.0031
P value summary	**
Are the survival curves sig different?	Yes

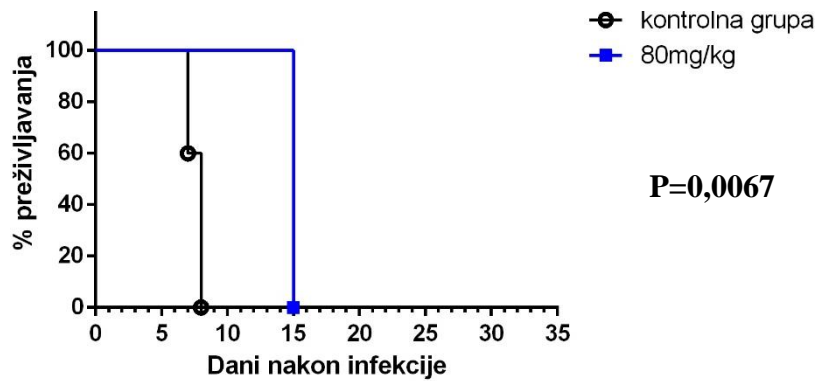
C) CIAQ1



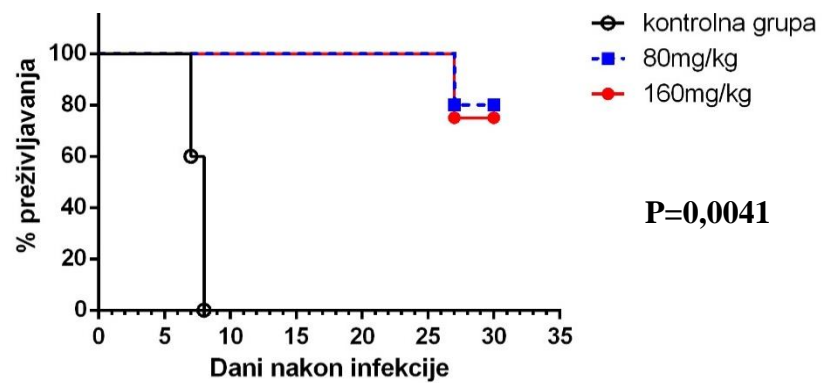
D) CIAQ2



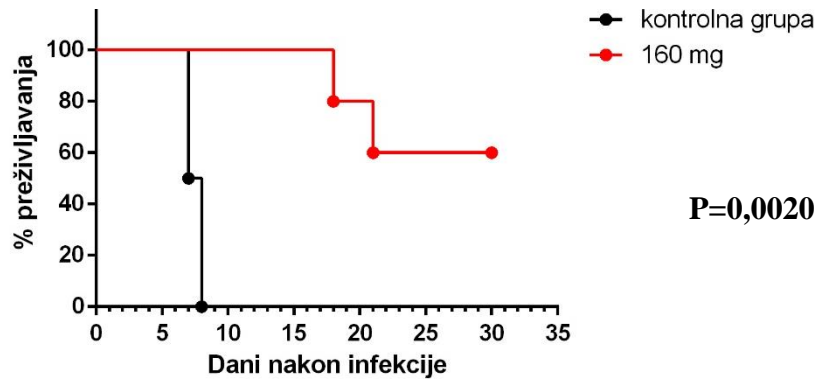
E) CIAQ3



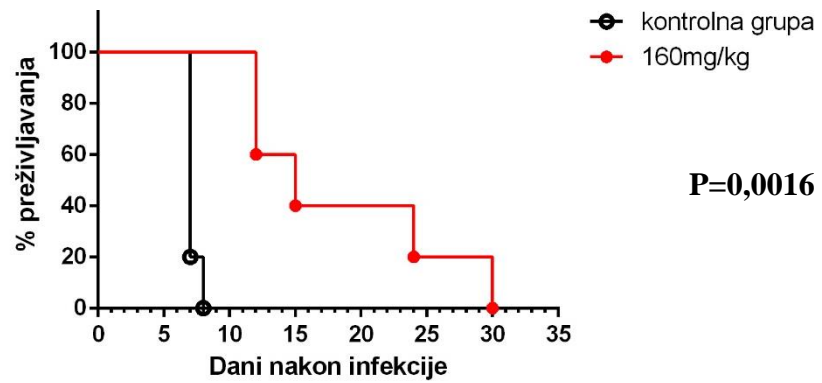
F) CIAQ4



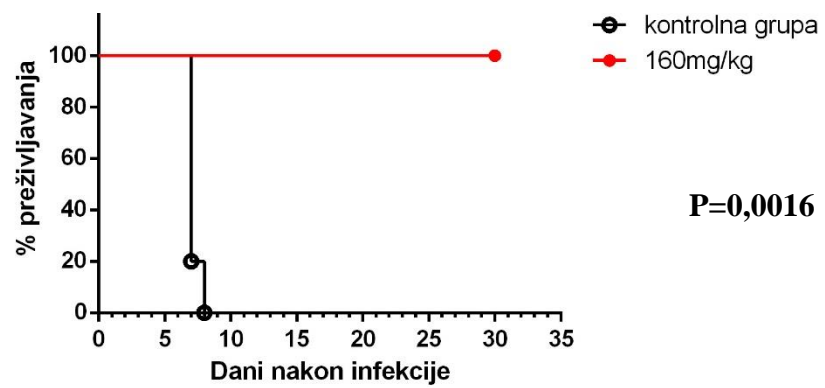
G) CIAQ5



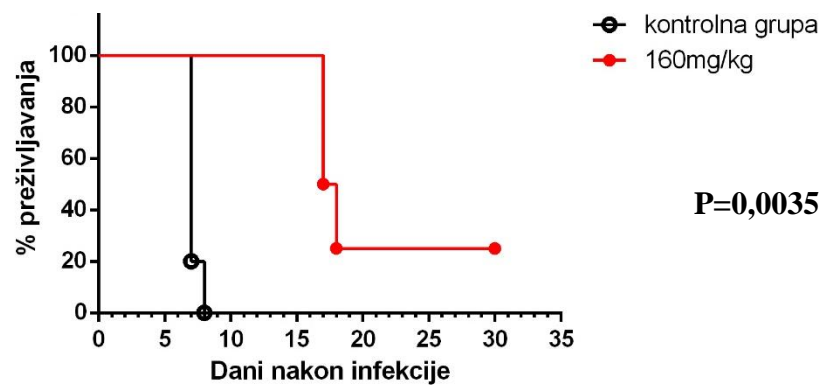
H) CIAQ7



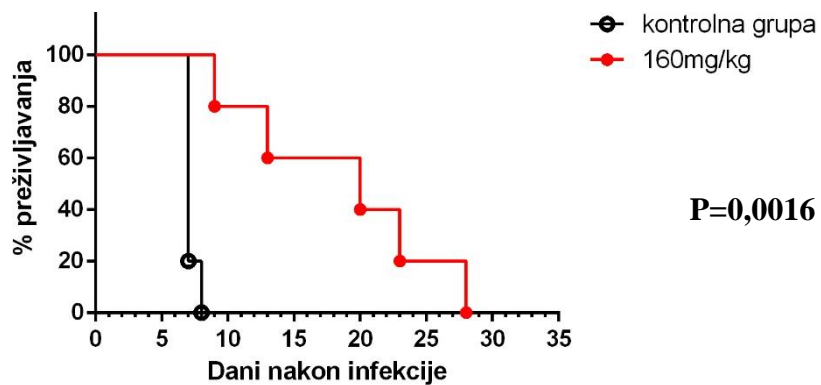
I) CIAQ8



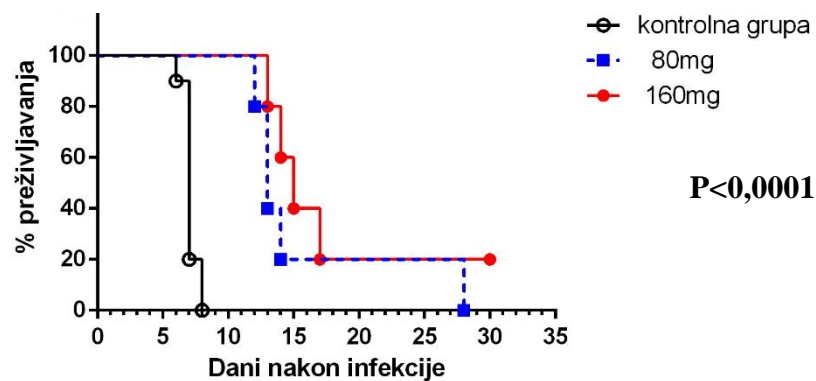
J) CIAQ9



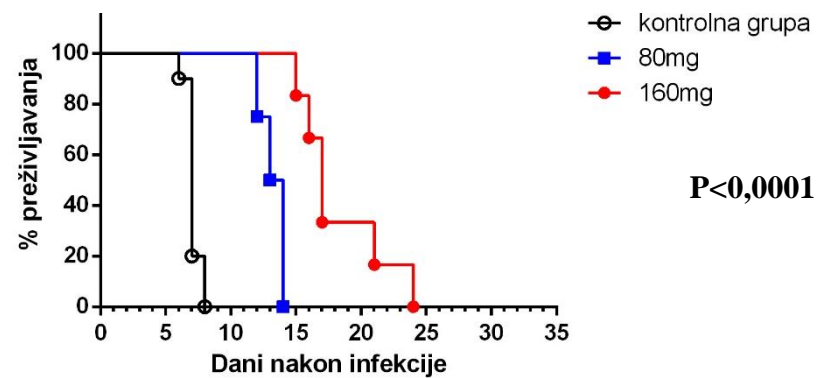
K) CIAQ11



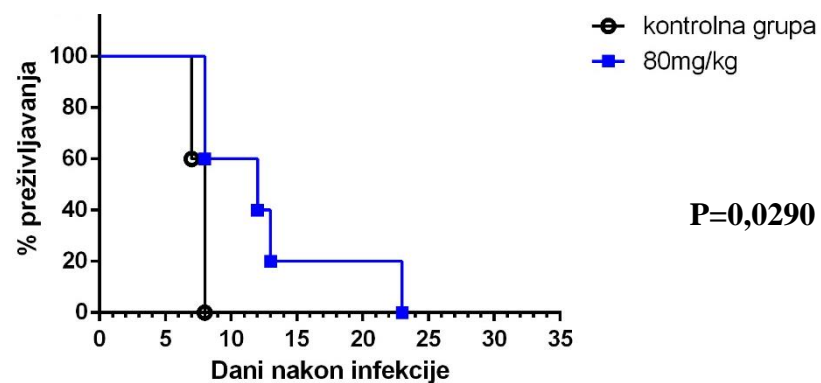
L) CIAQ13



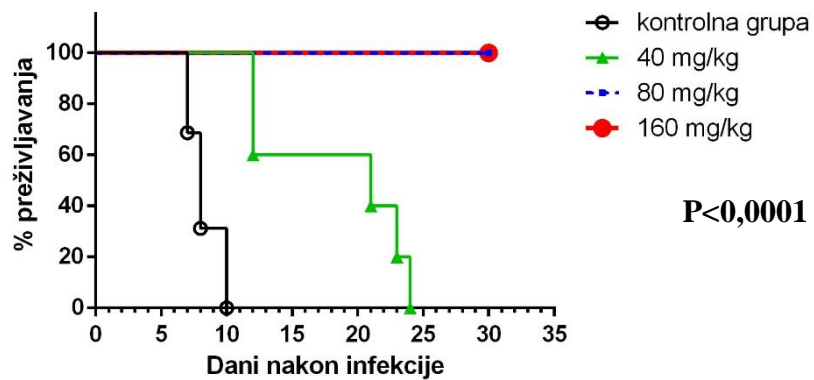
M) CIAQ15



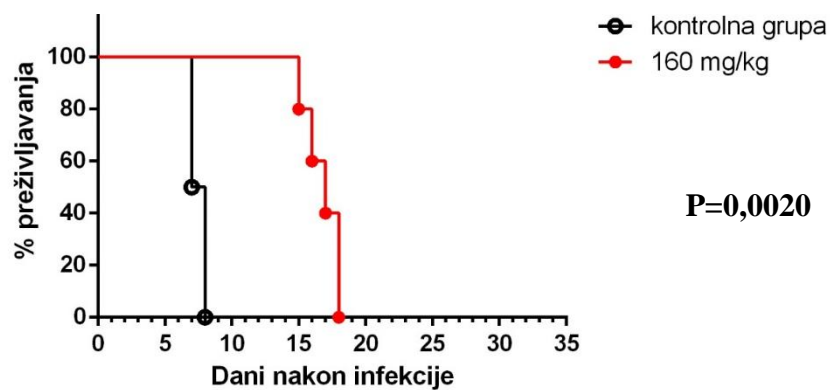
N) FAQ1



O) FCIAQ1

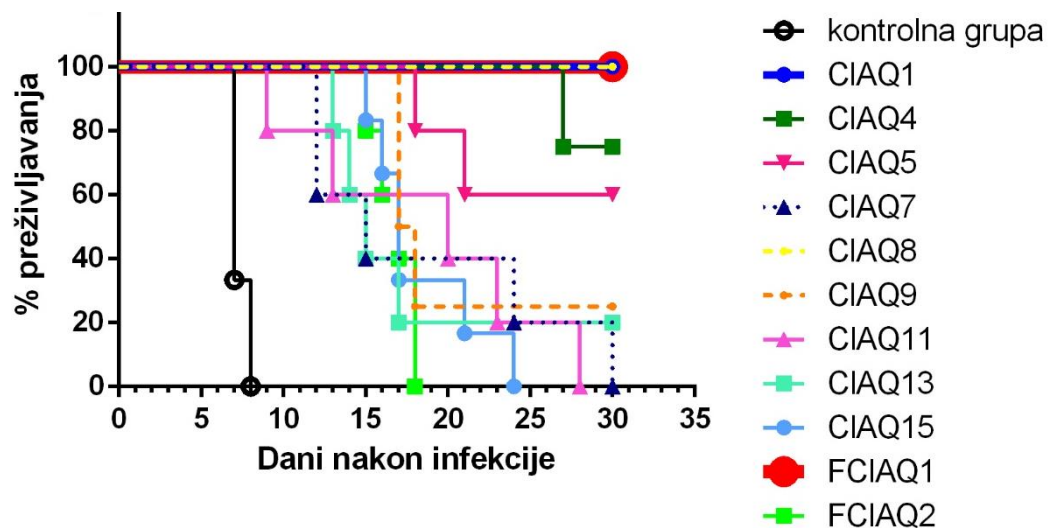


P) FCIAQ2

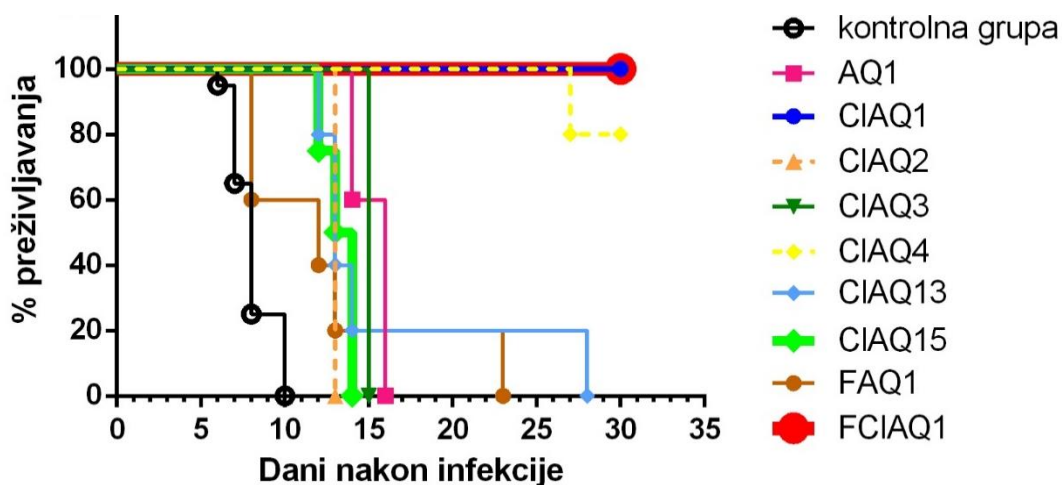


Grafikon 6. Efekat 3-dnevne primene kontrolnog (A) i ispitivanih (B-P) jedinjenja u definisanim (prikazanim) dozama na preživljavanje miševa inficiranih ANKA sojem *P. berghei* u odnosu na preživljavanje kontrolne grupe inficiranih netretiranih miševa.

U sledećem koraku interesovala nas je komparativna efikasnost različitih jedinjenja. U tom cilju izvršili smo poređenje stopa i vremena preživljavanja životinja tretiranih ispitivanim jedinjenjima u istoj dozi. Na Grafikonima 7 i 8 dat je uporedni prikaz kriva preživljavanja 11 jedinjenja primenjenih u dozi od 160 mg/kg/dan odnosno devet jedinjenja primenjenih u dozi od 80 mg/kg/dan.



Grafikon 7. Efekat 3-dnevne primene **11** ispitivanih jedinjenja u dozi od **160 mg/kg/dan** na preživljavanje miševa inficiranih ANKA sojem *P. berghei* ($P < 0,0001$)



Grafikon 8. Efekat 3-dnevne primene **devet** ispitivanih jedinjenja u dozi od **80 mg/kg/dan** na preživljavanje miševa inficiranih ANKA sojem *P. berghei* ($P < 0,0001$)

Statističkom analizom prikazanih podataka pokazano je da svih 15 jedinjenja primenjenih u dozi od 80 mg/kg/dan i/ili 160 mg/kg/dan značajno produžava život tretiranih inficiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu netretiranih inficiranih životinja ($P < 0,05$) (Tabela 11). Među njima, sedam jedinjenja (CIAQ1, CIAQ4, CIAQ5, CIAQ8, CIAQ9, CIAQ13 i FCIAQ1) primenjenih u dozama od 80 mg/kg/dan i/ili 160 mg/kg/dan omogućilo je preživljavanje 20-100% inficiranih miševa do 31. dana (Grafikon 6C, 6F, 6G, 6I, 6J, 6L, 6O), a posebno treba istaći da je maksimalnu stopu preživljavanja životinja (100%) omogućila primena jedinjenja CIAQ1 i FCIAQ1 u obe ispitivane doze (160 i 80 mg/kg/dan), kao i CIAQ8 u višoj (160 mg/kg/dan).

Tabela 11. Antimalarijska aktivnost novosintetisanih jedinjenja u *in vivo* sistemu

Doza (mg/kg/dan)	Jedinjenje	P vrednost	Grafikon 6
80	AQ1	0,0031	B
	CIAQ2	0,0031	D
	CIAQ3	0,0067	E
	FAQ1	0,0290	N
160	CIAQ5	0,0020	G
	CIAQ7	0,0016	H
	CIAQ8	0,0016	I
	CIAQ9	0,0035	J
	CIAQ11	0,0016	K
	FCIAQ2	0,0020	P
80 i 160	CIAQ1	<0,0001	C
	CIAQ4	0,0041	F
	CIAQ13	<0,0001	L
	CIAQ15	<0,0001	M
	FCIAQ1	<0,0001	O

4.2.2.2. Parazitemija

Parazitemija miševa u eksperimentalnim grupama praćena je mikroskopiranjem razmaza periferne krvi i to u više vremenskih tačaka. U slučaju da na kraju eksperimenata mikroskopiranjem nisu bili zapaženi paraziti, pristupalo se molekularnim metodama radi provere prisustva DNK parazita.

4.2.2.2.1. Praćenje parazitemije mikroskopijom krvnih razmaza

Tokom čitavog trajanja eksperimenta vršeno je redovno praćenje parazitemije eksperimentalnih životinja. Krv je uzorkovana dva puta nedeljno, počevši od uzorka neposredno pre terapije pa sve do kraja eksperimenta. Stope preživljavanja i nivoi parazitemije kod svake pojedinačne životinje prikazane su u Tabeli 12.

Kontrolni (netretirani inficirani) miševi su uginjavali 6-10 dana od infekcije, a 7. dana eksperimenta su dostizali nivo parazitemije u opsegu od 0,8 do 30%.

Parazitemija je važan parametar za razumevanje stvarnog efekta primene jedinjenja. Tako npr, iako je čak četiri jedinjenja (CIAQ4, CIAQ5, CIAQ9 i CIAQ13) omogućilo preživljavanje jednog broja miševa do 31. dana od infekcije, čak ni terapija najvišom dozom ovih jedinjenja nije kao krajnji efekat imala negativan mikroskopski nalaz na prisustvo parazita ni u jednoj jedinoj životinji. Drugim rečima, na osnovu prisustva parazitemije jasno je da i uprkos preživljavanju u datom periodu ukupni efekat jedinjenja nije eradikacija parazita te da bi u daljem toku eksperimenta (da je produžen) neminovno došlo do smrti. S druge strane, kod životinja tretiranih jedinjenjima CIAQ1, CIAQ8 i FCIAQ1 u dozama od 80 mg/kg/dan i/ili 160 mg/kg/dan, 100%-tno preživljavanje životinja do 31. dana praćeno je i potpunim odsustvom parazitemije (svi krvni razmazi bili su negativni na prisustvo parazita *P. berghei*) u svim ispitivanim vremenskim tačkama, što jasno ukazuje na odsustvo izvora infekcije te pokazuje da je krajnji efekat primenjenog tretmana izlečenje.

Uz ove rezultate, kao izuzetno zanimljivu treba istaći opservaciju da su sledeća jedinjenja primenjena u navedenim dozama omogućila da inficirani miševi žive sa izuzetno visokim procentom parazita u perifernoj krvi: CIAQ7 160 mg/kg/dan (86%), CIAQ4 160 mg/kg/dan (79,4%), CIAQ11 160 mg/kg/dan (75%), CIAQ9 160 mg/kg/dan (72%), CIAQ4 80 mg/kg/dan (66,3%), FCIAQ1 40 mg/kg/dan (62,4%), i CIAQ5 160 mg/kg/dan (59,4%).

Tabela 12. Stopa preživljavanja i parazitemija miševa inficiranih *P. berghei* tretiranih različitim dozama ispitivanih jedinjenja

JEDINJENJE mg/kg/dan	Br. miševa uginulih/ dan	Br. živih miševa i parazitemija (opseg, u %) u vremenskoj tački									Br. miševa živih 31. dana/ ukupan br. miševa (% preživljavanja)	
		Pre terapije	Dan 7	Dan 10	Dan 14	Dan 17	Dan 21	Dan 24	Dan 28			
AQ1	80	2/14, 3/16	5 (0,2-1)	5 (0)	3(0) 2 (0,2-0,9)	5 (1,4-2,5)	∅	∅	∅	∅	∅	0/5 (0)
CIAQ1	160	∅	5 (0,7-1,2)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5/5 (100)
	80	∅	5 (0,4-0,5)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5/5 (100)
	40	1/16, 2/17, 2/18	5 (0,3-2,4)	5 (0)	5 (0)	5 (0,2-1,2)	2 (2,1-4,6)	∅	∅	∅	∅	0/5 (0)
	20	2/14, 1/15, 1/18	4 (0,5-3,5)	4 (0)	4 (0,2-0,4)	2 (1-3,9)	1 (3,5)	∅	∅	∅	∅	0/4 (0)
	10	1/11, 3/13, 1/15	5 (0,4-1,6)	5 (0,18-0,5)	5 (1,6-8,9)	1 (4,3)	∅	∅	∅	∅	∅	0/5 (0)
CIAQ2	80	5/13	5 (0,2-1)	3 (0), 2 (0,2-0,3)	5 (0,6-1,9)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	0/5 (0)
CIAQ3	80	4/15	4 (0,2-0,7)	4 (0,2-0,3)	4 (0,4-0,6)	4 (1,3-2,7)	∅	∅	∅	∅	∅	0/4 (0)
CIAQ4	160	1/27	4 (0,4-0,9)	4 (0)	3 (0), 1 (0,2)	4 (0,2-1,2)	4 (0,5-1,7)	4 (1-37)	4 (7,4-26,8)	3 (15-79,4)	3/4 (75)	
	80	1/27	5 (0,1-1,7)	5 (0)	5 (0,2-0,4)	5 (0,6-3,5)	5 (1,2-6,5)	5 (2,4-15,2)	5 (6-43)	4 (6,8-66,3)	4/5 (80)	
CIAQ5	160	1/18, 1/21	5 (0,9-2,3)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0,3-4,4)	4 (2,3-3,8)	3 (6,7-19,7)	3 (27,2-59,4)	3/5 (60)	
CIAQ7	160	2/12, 1/15, 1/24, 1/30	5 (0,2-1)	5 (0,2-0,3)	5 (0,3-0,7)	3 (4-6,9)	2 (4,6-9,3)	2 (55,2-57)	1 (82)	1 (86)	0/5 (0)	
CIAQ8	160	∅	5 (0,3-0,9)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5/5 (100)	
CIAQ9	160	2/17, 1/18	4 (0,4-0,6)	4 (0,2-0,4)	4 (0,3-0,6)	4 (0,5-0,8)	2 (1,5-3,7)	1 (2,7)	1 (52)	1 (72)	1/4 (25)	
CIAQ11	160	1/9, 1/13, 1/20,1/23, 1/28	5 (0,2-0,6)	5 (0,2-10)	4 (9,2-15)	3 (12,8-47)	3 (50-60)	2 (64-70)	1 (75)	∅	0/5 (0)	
CIAQ13	160	1/13, 1/14, 1/15, 1/17	5 (0,3-1,1)	5 (0)	5 (0,1-1,1)	Nije uzorkovano	1 (5,1)	1 (17,1)	Nije uzorkovano	Nije uzorkovano	1/5 (20)	
	80	1/12, 2/13, 1/14, 1/28	5 (1,3-2,4)	5 (0,1-0,4)	5 (2,7-4,9)	1 (25)	Nije uzorkovano	Nije uzorkovano	1 (35)	∅	0/5 (0)	
CIAQ15	160	1/15, 1/16, 2/17,1/21, 1/24	6 (1,1-1,6)	6 (0)	6 (0,1-0,2)	Nije uzorkovano	2 (0,5-5,5)	1 (10,1)	∅	∅	0/6 (0)	
	80	1/12, 1/13, 2/14	4 (2-2,4)	4 (0,01-0,1)	4 (0,1-1,4)	∅	∅	∅	∅	∅	0/4 (0)	
FAQ1	80	2/8, 1/12, 1/13, 1/23	5 (0,4-1,4)	5 (1,3-26,8)	3 (3,2-25)	1 (7,7)	1 (17,5)	1 (35)	∅	∅	0/5 (0)	
FCIAQ1	160	∅	4 (0,3-0,5)	4 (0)	4 (0)	4 (0)	4 (0)	4 (0)	4 (0)	4 (0)	4/4 (100)	
	80	∅	6 (0,3-1)	6 (0)	6 (0)	6 (0)	6 (0)	6 (0)	6 (0)	6 (0)	6/6 (100)	
	40	2/12, 1/21, 1/23,1/24	5 (0,5-3)	5 (1-4,7)	5 (3,1-16,3)	3 (5,6-23)	3 (30-52,4)	2 (37,5-62,4)	∅	∅	0/5 (0)	
	20	2/7, 1/8, 1/14	4 (0,3-2,3)	2 (3,8-4)	1 (10)	∅	∅	∅	∅	∅	0/4 (0)	
	10	2/7, 1/8, 1/11, 1/12	5 (0,6-2,3)	3 (2,3-5)	2 (3,2-13,9)	∅	∅	∅	∅	∅	0/5 (0)	
FCIAQ2	160	1/15, 1/16, 1/17, 2/18	5 (0,5-1,5)	5 (0)	2 (0), 3 (0,1-0,4)	5 (0,16-3,4)	2 (6,9-10)	∅	∅	∅	0/5 (0)	
CQ	160	∅	5 (0,4-0,9)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5/5 (100)	
	80	1/17, 1/18	5 (0,5-0,9)	5 (0)	5 (0)	3 (0), 2 (0,1-0,2)	3 (0), 1 (4)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3/5 (60)	
	40	1/14, 1/15, 3/30	5 (0,4-2)	5 (0)	5 (0,1-1)	4 (0,6-1)	3 (8,7-22,6)	3 (25,4-43,4)	3 (50-60)	3 (55-65)	0/5 (0)	
	20	1/15,1/16, 1/18, 1/25	4 (0,1-0,8)	4 (0)	4 (0,6-1,8)	4 (0,7-3,5)	2 (6,4)	1 (11,1)	Nije uzorkovano	∅	0/4 (0)	
	10	1/14, 3/15, 1/16	5 (0,4-3,2)	5 (0)	5 (0,5-1)	5 (3,2-9)	∅	∅	∅	∅	0/5 (0)	

AQ 4-aminohinolini, CIAQ 7-hlor-4-aminohinolini; FAQ 3-fluor-4-aminohinolini; FCIAQ 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolini; FCIAQ 3-fluor-7-hlor-2-aminohinolini

4.2.2.2.2. Dokazivanje prisustva DNK parazita qPCR metodom

U ovom delu istraživanja, u cilju potvrde negativnog mikroskopskog nalaza svih krvnih razmaza životinja koje su tretirane sa CIAQ1 i FCIAQ1 (80 mg/kg/dan i 160 mg/kg/dan) i CIAQ8 (160 mg/kg/dan) dodatno je rađena provera prisustva DNK parazita molekularnom metodom. To jest, qPCR je rađen iz uzoraka krvi i jetre životinja preživelih do 31. dana (neposredno po isteku eksperimenta). Na ovaj način analizirani su po jedan uzorak krvi i homogenat jetre svakog preživelog miša tretiranog sa ova tri jedinjenja (Tabela 13).

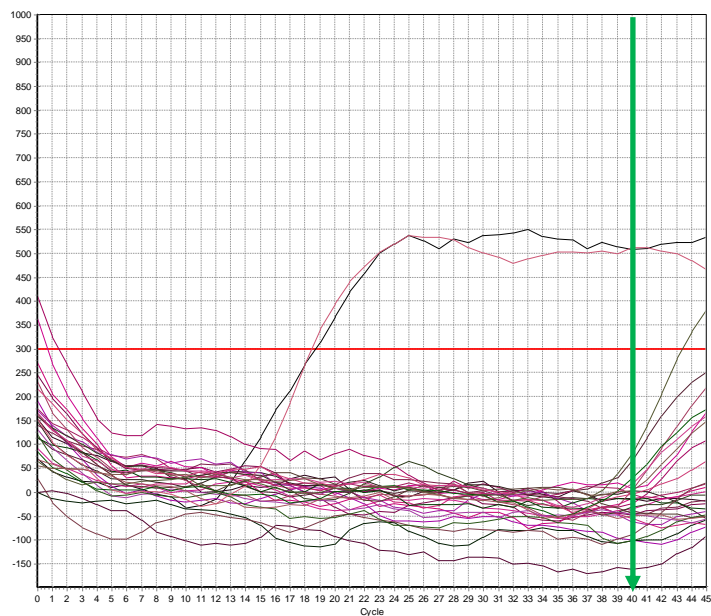
Tabela 13. qPCR analiza uzoraka krvi iz srca i tkiva jetre eksperimentalnih životinja

Jedinjenje	Doza mg/kg/dan	Broj miševa sa negativnim mikroskopskim nalazom	qPCR rezultat za uzorke krvi i jetre
CIAQ1	160	5	neg.
	80	5	neg.
CIAQ8	160	5	neg.
FCIAQ1	160	4	neg.
	80	6	neg.

neg. = negativno

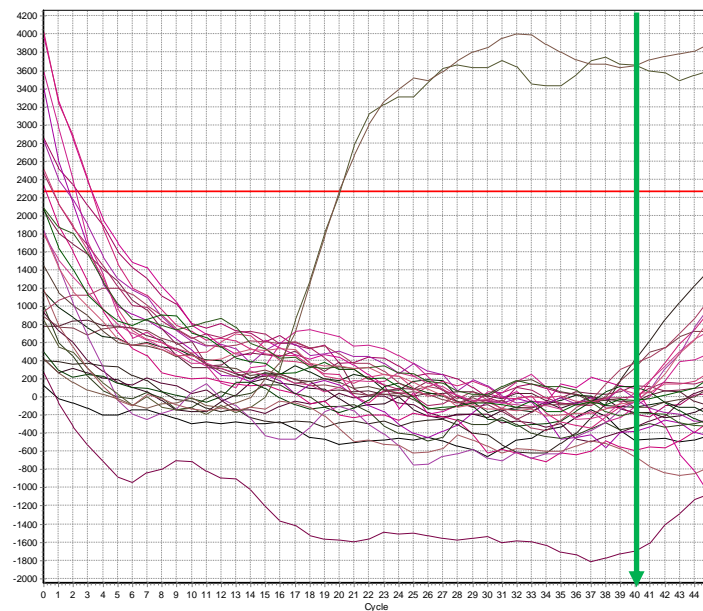
Ni u jednom ispitanom uzorku nije detektovana DNK *P. berghei*, što je ilustrovano prikazom reprezentativnih primera rezultata qPCR-a na Slici 12.

a)



Threshold: 300 (Noiseband)
Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

b)



Threshold: 2265 (Adjusted manually)
Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

Slika 12. qPCR analiza uzoraka (a) krvi iz srca i (b) tkiva jetre životinja tretiranih jedinjenjima CIAQ1 i FCIAQ1 u dozi od 80 mg/kg/dan. Horizontalna crvena linija predstavlja prag pozitivnosti za amplifikaciju. Vrednosti u okviru 40 ciklusa (do zelene vertikalne linije) i ispod praga pozitivnosti ukazuju na odsustvo ciljane DNK. Sve amplifikacione krive ispitivanih uzoraka nalaze se ispod praga pozitivnosti. Dve amplifikacione krive iznad praga pozitivnosti predstavljaju pozitivne kontrole (ANKA soj *P. berghei*).

4.2.3. ANALIZA REZULTATA ISPITIVANJA AKTIVNOSTI JEDINJENJA U *in vivo* MODEL SISTEMU

Analizom rezultata dobijenih praćenjem stope i dužine preživljavanja i parazitemije inficiranih miševa tretiranih novosintetisanim aminohinolinima utvrđeno je da svih 15 jedinjenja kada se primene u dozama od 80 mg/kg/dan i/ili 160 mg/kg/dan imaju antimalarijsku aktivnost u poređenju sa netretiranom kontrolnom grupom. Aktivnost se međutim veoma razlikovala na nivou pojedinačnih jedinjenja.

Grupe AQ i FAQ imale su po jednog predstavnika, AQ1 i FAQ1, koji u dozi od 80 mg/kg/dan produžili preživljavanje životinja u odnosu na kontrolu. Grupa FCIAQ je imala dva predstavnika, od kojih je FCIAQ1, primenjen u obe doze (160 mg/kg/dan i 80 mg/kg/dan) doveo do izlečenja svih životinja (100%), dok je FCIAQ2 u dozi od 160 mg/kg/dan samo produžio preživljavanje životinja u odnosu na kontrolu. Od 11 jedinjenja najbrojnije CIAQ grupe, pet jedinjenja omogućilo je produženo preživljavanje (CIAQ2, CIAQ3 u dozi od 80 mg/kg/dan; CIAQ7, CIAQ11 u dozi od 160 mg/kg/dan i CIAQ15 primenjen u obe doze), tri su omogućila preživljavanje do 31. dana sa nalazom parazita (CIAQ4 u dozama od 160 mg/kg/dan i 80 mg/kg/dan, a CIAQ5 i CIAQ9 u dozi 160 mg/kg/dan). Jedinjenje CIAQ13 je zavisno od doze bilo različito efikasno: doza od 80 mg/kg/dan je produžila preživljavanje, a dvostruko veća doza imala je kao učinak preživljavanje miševa do 31. dana ali uz nalaz parazita, dok su dva jedinjenja ove grupe dovela do izlečenja 100% životinja (CIAQ1 u dozama od 160 mg/kg/dan i 80 mg/kg/dan, a CIAQ8 u dozi 160 mg/kg/dan).

Među navedenim rezultatima, ističu se tri jedinjenja (CIAQ1, CIAQ8, FCIAQ1) koja su dovela do izlečenja svi životinja, a preživljavanje je bilo praćeno i kompletnim klirensom parazita koji je pokazan ne samo mikroskopskim pregledom krvnog razmaza, nego i potvrđen qPCR analizom krvi i tkiva jetre preživelih životinja. Zato su jedinjenja CIAQ1 i FCIAQ1 primenjena i u nizu dvostruko nižih doza (40 mg/kg/dan, 20 mg/kg/dan i 10 mg/kg/dan). Primena u ovim dozama umanjila je i efekat; nije došlo do izlečenja miševa ali je jedinjenje CIAQ1 (Grafikon 6C) produžilo preživljavanje u sve tri doze, dok je jedinjenje FCIAQ1 (Grafikon 6O) imalo efekat samo u dozi od 40, a ne i pri primeni u dve najniže doze od 10 mg/kg/dan i 20 mg/kg/dan ($P > 0.05$).

4.3. UPOREDNA ANALIZA AKTIVNOSTI NOVOSINTETISANIH JEDINJENJA DOBIJENIH ISPITIVANJEM U *in vitro* I *in vivo* MODEL SISTEMIMA

Osim pojedinačnog sagledavanja antimalarijske aktivnosti novosintetisanih aminohinolina u *in vitro* odnosno u *in vivo* sistemu, rezultati ove dve grupe eksperimenata sagledani su i zajedno, jer se međusobno dopunjuju (Tabela 14). U odnosu na početni broj od 37 jedinjenja, čak 15 (40,54%) jedinjenja je pokazalo značajan efekat u modelu mišje malarije, a među njima su primenom tri jedinjenja u potpunosti izlečene sve inficirane životinje.

Ono što je posebno značajno jeste da su se među 15 najaktivnijih našla i sva četiri jedinjenja koja se na osnovu IC₅₀ vrednosti nisu kvalifikovala za ispitivanja u *in vivo* sistemu, dok je jedno od njih, FCIAQ1, čak u dve eksperimentalne doze dovelo do izlečenja 100% životinja. Dakle, da smo ga na samom početku rada isključili iz ispitivanja, ovaj vredan rezultat bio bi propušten. Ovaj slučaj ukazuje na diskrepancu među rezultatima dobijenim na osnovu ispitivanja aktivnosti u *in vitro* i *in vivo* sistemima. Diskrepanca ovog tipa ali obrnutog smera može se ilustrovati i na primeru jedinog jedinjenja, AQ1, koje je u *in vitro* sistemu na oba ispitivana soja bilo bolje od CQ. Iako je bilo očekivano da će imati značajan *in vivo* efekat, ono je samo produžilo život tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu.

Pored toga, nekoliko jedinjenja (CIAQ7, CIAQ4, CIAQ11, CIAQ9, FCIAQ1, CIAQ5) omogućilo je preživljavanje miševa sa veoma visokim nalazom parazita u perifernoj krvi (59,4%-86%) što upućuje na to da ta jedinjenja na neki način utiču na patogenost/virulenciju parazita *P. berghei*.

Tabela 14. Antimalarijski efekat novosintetisanih aminohinolina ispitanih u *in vitro* i *in vivo* model sistemima

GRUPA	JEDINJENJE	<i>In vitro</i> LDH esej geometrijska srednja vrednost IC ₅₀ (nM)		<i>In vivo</i> (Tompsonov test)		
		Soj 3D7	Soj Dd2	TOKSIČNOST 160 mg/kg/day	TERAPIJSKA DOZA (mg/kg/day)	EFEKAT na dan 31 p.i.
AQ	AQ1	14,08	118,2	NT	80	produženo preživljavanje* (P=0,0031)
	AQ2	99,86	195,3	T		
	AQ3	67,33	223,0	T		
	AQ4	18,77	73,35	Nedostupan		
	AQ5	119,58	71,52	NT	Nedostupan	
CIAQ	CIAQ1	34,75	58,4	NT	160, 80	100% izlečenje (P=0,002, 0,0027)
					40, 20, 10	produženo preživljavanje* (P=0,0031; 0,0067; 0,0031)
	CIAQ2	142,70	>500	NT	80	produženo preživljavanje* (P=0,0031)
	CIAQ3	43,48	34,8	T	80	produženo preživljavanje* (P=0,0067)
	CIAQ4	32,53	13,7	NT	160	75% preživljavanje** (P=0,0067)
					80	80% preživljavanje** (P=0,0031)
	CIAQ5	34,13	16,7	NT	160	60% preživljavanje** (P=0,002)
	CIAQ6	67,07	35,9	T		
	CIAQ7	>500	14,43	NT	160	produženo preživljavanje* (P=0,0016)
	CIAQ8	21,37	25,43	NT	160	100% izlečenje (P=0,0016)
	CIAQ9	82,35	186,79	NT	160	25% preživljavanje** (P=0,0035)
	CIAQ10	50,23	18,57	Nedostupan		
	CIAQ11	97,26	174,12	NT	160	produženo preživljavanje* (P=0,0016)
	CIAQ12	32,2	40,82	Nedostupan		
	CIAQ13	22,05	37,97	NT	160	20% preživljavanje** (P=0,0027)
80					produženo preživljavanje* (P=0,0026)	
CIAQ15	30,11	18,81	NT	160, 80	produženo preživljavanje* (P=0,0016; 0,0062)	
FAQ	FAQ1	185,38	>500	NT	80	produženo preživljavanje* (P=0,0290)
FCIAQ	FCIAQ1	41,13	>500	NT	160, 80	100% izlečenje (P=0,0199; 0,0016)
					40	produženo preživljavanje* (0,0031)
					20, 10	NZ (P>0,05)
	FCIAQ2	145,36	>500	NT	160	produženo preživljavanje* (P=0,0020)
CONTROL	CQ	18,63	270,57	NT	160	100% izlečenje (P=0,0016)
					80	60% izlečenje (P=0,0016)
					40, 20, 10	produženo preživljavanje* (0,0027; 0,0047; 0,0027)

LDH, laktat dehidrogenaza; IC₅₀, 50% inhibitorna koncentracija; p.i., posle infekcije; AQ, 4-aminohinolini; CIAQ, 7-hlor-4-aminohinolini; FAQ, 3-fluor-4-aminohinolini; FCIAQ, 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolini; CQ, hlorokvin; NT, netoksičan; T, toksičan; NZ, nema značajnosti *u odnosu na inficirane netretirane (kontrolne) miševе.

**sa rezidualnom parazitacijom

5. DISKUSIJA

Idealan antimalarik je bezbedan i efikasan lek koji može da se primeni i kod ugroženih kategorija bolesnika (dece i trudnica), nalazi se u odgovarajućoj formulaciji za oralnu upotrebu, a ekonomski je pristupačan s obzirom na to da su malarijom pogođeni siromašni delovi sveta (Ridley, 2002). Pronalaženje i razvoj svakog novog leka, pa i antimalarika, izuzetno je složen i dugotrajan proces (Tamimi i Ellis, 2009) koji obuhvata otkriće („*discovery*“) vodećeg jedinjenja, njegovu optimizaciju, pretklinička i klinička istraživanja (Payne DJ i sar. 2007). Vodeće jedinjenje je struktura koja ispitivanjem u *in vitro* i *in vivo* sistemima pokazuje značajnu aktivnost. Nekada su neophodne hemijske modifikacije početne strukture u cilju poboljšanja efikasnosti, selektivnosti ili farmakokinetičkih parametara (apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija), kojima se ona optimizuje do jedinjenja koje obećava ili serije strukturno sličnih jedinjenja. Pretklinička ispitivanja obuhvataju detaljne farmakodinamičke, farmakokinetičke i toksikološke studije koje traju oko pet godina a izvode se u *in vitro* sistemima i na životinjskim modelima. Najzad, za ona jedinjenja koja se pokažu uspešnim i u svim fazama kliničkih istraživanja (ispitivanjem na ljudima), sledi isto tako složen i dugotrajan proces koji obuhvata različite „*downstream*“ aktivnosti koje uključuju način proizvodnje na veliko, način transporta i čuvanja (npr. potreba za hladnim lancem), a neizbežni su i često ključni ekonomsko-tržišni aspekti koji uključuju analizu odnosa proizvodne i prodajne cene i sl. Procenjeno vreme od otkrića vodećeg jedinjenja do komercijalizacije antimalarika je između 12 i 15 godina (Burrows i sar., 2013).

Jasno je da će za neke vrste lekova (za terapiju kardiovaskularnih ili malignih bolesti) tržište biti daleko bogatije i veće nego za npr. zanemarene infektivne bolesti (*neglected infectious diseases, NID*) koje pogađaju brojčano ogromnu populaciju – radi se o stotinama miliona ljudi – ali koja uglavnom nastanjuje najsiromašnija područja sveta. Otuda su takvi lekovi nazvani lekovima siročićima („*orphan drugs*“). Ovakva situacija odvraća farmaceutsku industriju od napora u razvoju novih lekova za terapiju ovih bolesti, od kojih su neke među „*most debilitating diseases*“ zbog čega je nužna podrška javnih fondova bar u početnim fazama razvoja. Iako se situacija bar što se malarije, tuberkuloze i HIV infekcije tiče, u velikoj meri popravila poslednje dve decenije, pre svega angažovanjem velikih organizacija kao što su Globalni Fond, *Bill & Melinda Gates Foundation*, *Wellcome Trust* i sl., uloga akademskih istraživanja u razvoju vodećih struktura i u slučaju antimalarika i dalje ostaje značajna ako ne i presudna. Meru u kojoj svet danas podstiče razvoj novih lekova protiv NID, a posebno protiv malarije ilustruje činjenica da su dobitnici Nobelove nagrade za medicinu za 2015. godinu, dakle pre svega nekoliko godina – kada je ovo istraživanje bilo uveliko u toku – upravo naučnici koji su tragali za novim lekovima protiv parazitskih bolesti filarijaze i malarije! Za rad na novim antimalaricima nagrađena je kineska naučnica Youyou Tu, za svoja ispitivanja antimalaričnih svojstava aktivnih principa pominjane *A. annua*, biljke karakteristične za tradicionalnu kinesku medicinu.

U kontekstu ovog istraživanja posebno je interesantno pomenuti da su početkom 70-ih godina XX veka dve istraživačke grupe (kineska, na čelu sa Youyou Tu, i jugoslovenska) nezavisno radile na izolaciji i karakterizaciji aktivnih principa *A. annua*. Jugoslovenska grupa je *A. annua* sakupila u oktobru 1970. godine na lokalitetu u blizini centra Beograda (Staro sajmište) na levoj obali reke Save, i započeta su istraživanja na Odeljenju za hemiju (sada Hemijski fakultet) Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Milutina Stefanovića i prof. dr Dragoslava Jeremića. Ova grupa je prva izolovala artemizinin i predstavila njegovu strukturu na skupu *8th International Symposium on the Chemistry of Natural Products* (New Delhi, 1972), ali je nažalost izostala publikacija u punom obimu (Vajs i sar., 2017). S druge strane, iako je kineska grupa izolaciju izvršila skoro dve godine kasnije, očito su imali svest o vrednosti svojih rezultata i o značaju njihovog saopštavanja naučnoj javnosti, što je rezultovalo publikacijom iz 1977. godine. Bez obzira na ovakav epilog

pionirskih istraživanja antimalarika u našoj zemlji, ona su se u kontinuitetu nastavila do današnjeg dana. O tome svedoče brojne kasnije publikacije, sve do ove doktorske disertacije koja obuhvata ispitivanje antimalarijskog potencijala 37 novosintetisanih aminohinolina sa modifikacijama na aminohinolinskom jezgru i bočnom lancu koji su sintetisani na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u grupi prof. dr Bogdana Šolaje, naslednika prof. dr Milutina Stefanovića.

Pristup koji je korišćen prilikom sinteze ovih jedinjenja najviše odgovara razvoju analoga postojećih lekova. Ovakva strategija podrazumeva unapređenje strukture postojećih jedinjenja inovativnim hemijskim modifikacijama, dok je mehanizam delovanja osnovne strukture delimično poznat (Rosenthal, 2003). Sva ovde ispitana jedinjenja u osnovi imaju hinolinski prsten, farmakoforu koja se nalazi u CQ i za koju se zna da poseduje antimalarijsku aktivnost, a za njega su vezani bočni lanci različite strukture koji imaju ulogu nosača. S obzirom na to da je aktivnost hinolinskog prstena poznata, na ovaj način se sagledava uticaj novog dela strukture (nosača) na aktivnost.

Na početku istraživanja je postavljen izuzetno zahtevan zadatak, a to je da se dopuni široki spektar postojećih vodećih jedinjenja sa antimalarijskim potencijalom. Pregledom literature uočeno je da se brojne studije ove vrste baziraju samo na ispitivanjima aktivnosti jedinjenja u *in vitro* sistemu (Madrid i sar., 2006; Hwang i sar., 2011; Casagrande i sar., 2012; Carvalho i sar., 2016), a u slučaju da se neka jedinjenja istaknu po dobroj aktivnosti, ispitivanje njihove aktivnosti i na životinjskom modelu uglavnom predstavlja plan za buduće eksperimente (istog ili drugih timova). Ova studija se u tom pogledu može smatrati kompletnom jer obuhvata ispitivanje aktivnosti novosintetisanih jedinjenja kako u *in vitro* tako i u *in vivo* sistemu.

Pre svega, bilo je neophodno napraviti adekvatan odabir *in vitro* i *in vivo* model sistema za ispitivanje antimalarijske aktivnosti jedinjenja iz širokog spektra modela opisanih u literaturi (Fidock i sar., 2004). Prvi testovi za ispitivanje antimalarijske aktivnosti u *in vitro* sistemu su razvijeni na inicijativu SZO u cilju praćenja razvoja rezistencije *Plasmodium* parazita na postojeće lekove (Basco, 2007). Najpre je 1968. godine razvijen tzv. „makrotest“ koji je korišćen do kraja osamdesetih godina. Test se zasniva na poređenju broja šizonata u uzorku (od 1 mL krvi) uzetom iz test bočica u kojima su paraziti inkubirani sa ispitivanim lekom sa brojem šizonata u kontrolnim

bočicama (paraziti bez leka). Veliki preokret dogodio se kada Trager i Jansen razvijaju novi *in vitro* model sistem za kontinuiranu kultivaciju *P. falciparum* (Trager i Jensen, 1976), čime je počela era razvoja različitih tzv. mikrotestova. Već od 1978. godine u upotrebi je mikrotest koji je nastao modifikacijom makrotesta, a izvodi se u mikrotitarskoj ploči što omogućava korišćenje uzorka manjeg volumena (koji se meri μL). Ubrzo se razvija veliki broj različitih eseja, koje su nedavno hronološki prikazali Sinha i saradnici a mogu se svrstati u četiri velike grupe: radioizotopski, eseji zasnovani na protočnoj citometriji (eng. *flow cytometry*), enzimski i fluorescentni (Sinha S i sar., 2017). Radioizotopski eseji su zasnovani na činjenici da *Plasmodium sp.* koriste egzogene purine jer nisu u stanju da ih sintetišu *de novo*. Radioizotopi koji se koriste su [3H] hipoksantin i [3H] etanolamin, a količina prekursora ugrađena u parazit direktno je proporcionalna broju inficiranih Er. Esej ugradnje hipoksantina uveden je u upotrebu 1979. godine. Godine 1990. pojavljuju se *flow cytometry* eseji koji detektuju parazitsku DNK (humani Er nemaju DNK). Prvi u nizu enzimskih eseja bio je LDH esej (enzim pLDH) koji se koristi od 1993. godine (Wein i sar., 2010). Drugi *Plasmodium* protein koji se nalazi u osnovi enzimskih eseja je protein bogat histidinom II. Osnovni princip enzimskih eseja jeste merenje nivoa oslobođenog enzima koji je direktno proporcionalan rastu parazita. Najzad, poslednje u nizu su nove fluorescentne tehnike koje se uvode u upotrebu od 2004. godine. One koriste različite fluorescentne boje (etidijum bromid, DAPI, SYBR Green I, YOYO-1 i PicoGreen) koje se vezuju za parazitsku DNK, a intenzitet fluorescencije je proporcionalan njenoj količini.

Današnji trend u ispitivanju aktivnosti antimalarika u *in vitro* modelima je skrining velikog kapaciteta (eng. *high throughput screening, HTS*), tehnologija koja ubrzava identifikaciju vodećih struktura tako što omogućava istovremeno ispitivanje vrlo velikog, do sad nezamislivog broja jedinjenja sa antimalarijskim potencijalom, što nije moguće upotrebom konvencionalnih tehnika (Aguiar i sar., 2012). Jedan od dva pristupa HTS se zasniva na utvrđivanju fenotipskih promena koje nastaju izlaganjem celih ćelija ili mikroorganizama potencijalnim kandidatima za lekove. Drugi pristup odnosi se na ispitivanje uticaja ispitivanih jedinjenja na određeni prečišćeni ciljani molekul (protein i/ili enzim) koji je neophodan za preživljavanje parazita (Flannery i sar. 2013). Ova tehnologija je naučnoj javnosti prvi put prezentovana 1988. godine (Pereira i Williams, 2007) i predstavlja automatizovanu proceduru koja koristi male zapremine uzoraka i

povezana je sa naprednom računarskom tehnologijom. Navedene prednosti su znatno smanjile cenu ispitivanja potencijalne antimalarijske aktivnosti nosivih sintetičkih derivata i obezbedile značajnu uštedu vremena što je bio jedan od podsticaja za velike farmaceutske kompanije da se uključe u potragu za novim antimalaricima. S druge strane, kako je ranije pomenuto, farmaceutska industrija dugo nije videla direktnu materijalnu dobit kroz takva istraživanja, tako da je bio neophodan i dodatni finansijski podstrek za rad na razvoju i pronalaženju novog leka protiv malarije. U tom cilju je 1999. godine osnovana organizacija *Medicines for Malaria Venture* koja daje finansijsku podršku, okuplja naučnike iz akademskog i industrijskog okruženja, i formira multidisciplinarnе timove za otkrivanje i razvoj lekova. Pomenuti finansijski podsticaj omogućio je izvođenje fenotipskog HTS za 4.000.000 struktura koje su se nalazile u okviru biblioteka jedinjenja *St. Jude Children's Research Hospital*, *Novartis* i *Glaxo Smith Kline*. Na osnovu rezultata HTS-a odabrano je 400 raznovrsnih hemijskih struktura sa antimalarijskom aktivnošću i formirana je banka jedinjenja pod nazivom *Malaria box*, (Spangenberg i sar., 2013). Jedinjenja su postala javno dostupna za dalja ispitivanja naučnicima širom sveta, a od korisnika ove banke traženo je da objavljuju rezultate i stavljaju ih na uvid naučnoj zajednici (Guiguenne i sar., 2012). Generalno govoreći, primena HTS-a je doprinela tome da kandidati za novi antimalarik iz godine u godinu budu sve brojniji i raznovrsniji (Anthony i sar., 2012; Hovlid i Winzeler, 2016), dok je jedan od izazova za narednu deceniju da se osigura njihova registracija i dostupnost stanovništvu zemalja najugroženijih malarijom (Wells i sar., 2015).

Jasno je da je HTS danas dostupan velikim farmaceutskim kompanijama, dok veliki broj istraživačkih grupa širom sveta i dalje daje svoj doprinos sintezom različitih derivata, zasnivajući ispitivanja u *in vitro* sistemu na nekom od navedenih ručnih mikrotestova na sojevima *P. falciparum* kultivisanim u humanim Er (Mokgethi-Morule i N'Da, 2016). Prilikom odabira *in vitro* model sistema za ovo istraživanje, cilj je bio pronaći test koji će pre svega biti pouzdan, ali i ekonomski dostupan. Razmatranjem prethodno opisanih testova odabran je LDH esej (Makler i sar., 1993) koji je veoma osetljiv, brz, jeftin i daje reproducibilne rezultate, a da pritom njegovo izvođenje ne zahteva skupu opremu i nije tehnički zametno (Sinha S i sar., 2017). Međutim, treba imati na umu da rezultati eksperimenata u *in vitro* sistemu prikazuju samo osetljivost patogena na lek, ali ne uključuju i „element“ domaćina (Mokgethi-Morule i N'Da, 2016) jer se ne

uzima u obzir fiziološko okruženje u kome se i parazit i jedinjenje nalaze u organizmu. S druge strane, životinjski modeli predstavljaju složen sistem koji omogućava ispitivanje toksičnosti i efikasnosti i nekih farmakokinetičkih parametara ispitivanih jedinjenja. Dobra aktivnost u *in vivo* model sistemu je upravo ono što kvalifikuje jedinjenja za dalja preklinička ispitivanja. Dakle, čak i izuzetna aktivnost jedinjenja u *in vitro* sistemu u slučaju odsustva efekta u *in vivo* modelu nemilosrdno eliminiše jedinjenje iz daljeg toka istraživanja. Rezultati dobijeni ispitivanjem aktivnosti jedinjenja u *in vivo* model sistemu su od suštinskog značaja, pa tako Jiménez-Díaz i sar. čak predlažu umesto ispitivanja u *in vitro* a zatim u *in vivo* sistemu uvođenje racionalnog skrininga aktivnosti jedinjenja u *in vivo* modelu u ranijim fazama razvoja novog leka, koji bi koristio samo po dve eksperimentalne životinje, čime bi se uz smanjenje broja korišćenih životinja ubrzao razvoj novih antimalarijskih lekova (Jiménez-Díaz i sar., 2013; Jiménez-Díaz i sar., 2014).

Za izvođenje eksperimenata u *in vivo* uslovima najčešće se koriste mišji modeli pre svega jer je miš osetljiv na infekciju *Plasmodium* parazitima, potom zbog male količine supstance, proporcionalne veličini životinje, potrebne za ispitivanja, kao i činjenice da su ovi modeli dostupni većini laboratorija. U oblasti eksperimentalne malarije koriste se četiri *Plasmodium* vrste koje su izazivači ove bolesti kod glodara: *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* i *P. yoelii* (Landau i Gautret, 1998), a *P. berghei* je najčešće korišćena vrsta. Najčešće primenjivani testovi za *in vivo* ispitivanje antimalarijske aktivnosti jedinjenja su četvorodnevni supresivni test (Peters i Robinson, 1999) i modifikovan *Thompson*-ov test (Ager, 1984), kao robusne i ponovljive metode (Fidock i sar., 2004). U četvorodnevnom supresivnom testu primena ispitivanog jedinjenja počinje jedan do tri sata nakon inokulacije parazitiranih Er, a parazitacija se meri petog dana, 24 h nakon poslednje doze. S druge strane, *Thompson*-ov test podrazumeva trodnevnu terapiju miševa koji su već razvili *P. berghei* infekciju, odnosno terapija jedinjenjem koje se ispituje započinje 72h nakon infekcije parazitiranim Er, a potom se prati preživljavanje životinja. Upravo je ovo metoda izabrana kao *in vivo* test u okviru ove doktorske disertacije, a postupak izvođenja je detaljno opisan u poglavlju 3.3.2.2..

Ispitivanje antimalarijskog potencijala u odabranim *in vitro* i *in vivo* model sistemima dalo je rezultate čijom analizom se uočava da i male strukturne promene u velikoj meri utiču na antimalarijsku aktivnost. Cilj je bio da se što pažljivije sagledaju i uporede razlike među ovim u osnovi sličnim jedinjenjima, jer se upravo ovakvim hemijskim modifikacijama optimizuje vodeće jedinjenje. Tako, među 37 ispitivanih aminohinolina, prema osnovnom aminohinolinskom jezgru, jedinjenja su podeljena na grupe 4-aminohinolone (AQ), 7-hlor-4-aminohinolone (ClAQ), 3-fluor-4-aminohinolone (FAQ), 3-fluor-7-hlor-4-aminohinolone (FCIAQ) i 3-fluor-7-hlor-2-aminohinolone (FCl2AQ), dok su na osnovu modifikacija izvršenih na bočnom lancu u pitanju bila adamantanska, benzotiofenska, tiofenska jedinjenja, jedinjenja sa benzenovim prstenom ili jedinjenja jednostavne strukture.

Preliminarnim ispitivanjem (skriningom) aktivnosti u *in vitro* model sistemu čak 22/37 (59,5%) jedinjenja odabrano je za dalje eksperimente jer je inhibiralo rast $\geq 50\%$ parazita bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum*. Sva jedinjenja iz grupe AQ (5/5, 100%) i skoro svi ClAQ derivati (14/15, 99,3%) su ispunili zadati kriterijum. U okviru FAQ grupe za dalja ispitivanja kvalifikovala se polovina jedinjenja (50%, 1/2), dok je iz FCIAQ grupe samo 25% (2/8) jedinjenja zadovoljilo postavljeni kriterijum. Važno je naglasiti da se među jedinjenjima koja su inhibirala rast $\geq 50\%$ parazita bar jednog od ispitivanih sojeva *P. falciparum* nije našao nijedan od predstavnika grupe 2-aminohinolona (FCl2AQ). Nasuprot ovome, sva odabrana jedinjenja kao zajedničku strukturu imaju 4-aminohinolin, čime je potvrđeno da antimalarijska aktivnost potiče upravo od ovog prstena (O'Neill i sar., 1998; O'Neill i sar., 2006) koji ima glavnu ulogu u kompleksiranju sa hematinom pri čemu je sprečeno formiranje hemozoina i dalji rast parazita (Cheruku i sar., 2003). Sagledano sa aspekta bočnog lanca, na osnovu rezultata izvedenog skrininga, za dalja ispitivanja odabrano je čak 100% benzotiofenskih (8/8) i tiofenskih (2/2) derivata, 75% jedinjenja sa benzenovim prstenom (3/4), 42% adamantanskih derivata (8/19) i 25% jednostavnih struktura (1/4).

U sledećoj fazi istraživanja, odabrana jedinjenja su titrirana do preciznih IC_{50} vrednosti u cilju određivanja njihove aktivnosti poređenjem sa IC_{50} vrednostima kontrolnog CQ. Analizom rezultata uočeno je da postoji samo jedno jedinjenje (1/22, 4.5%), i to AQ1, koje je aktivnije od CQ prema soju 3D7. Ovo je ujedno i jedino jedinjenje koje je prema oba soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2) imalo bolji antimalarijski efekat od CQ u *in vitro* sistemu. S druge strane, čak 81.8% jedinjenja (18/22), među kojima i AQ1, pokazalo je bolju aktivnost prema Dd2 soju. Međutim, izdvojila su se i četiri jedinjenja čija je aktivnost bila lošija prema oba soja *P. falciparum* (CIAQ2, FAQ1, FCIAQ1, FCIAQ2). Štaviše, njihova antimalarijska aktivnost prema Dd2 soju u potpunosti je izostala ($IC_{50} > 500$ nM). Međutim, sva četiri jedinjenja uključena su u dalja ispitivanja u *in vivo* model sistemima. To je učinjeno u cilju provere korelacije antimalarijske aktivnosti jedinjenja dobijene na osnovu ispitivanja u *in vitro* i *in vivo* sistemima, jer je pregledom literature uočeno da postoje prijavljeni slučajevi diskrepance između rezultata dobijenih u ova dva sistema.

Yearick i sar. su na osnovu rezultata ispitivanja antimalarijskog potencijala grupe novosintetisanih 7-hlor-4-aminohinolina sa modifikovanim bočnim lancem u *in vitro* sistemu zaključili da upravo ovaj vid modifikacije treba izvesti u cilju prevazilaženja rezistencije koju parazit ispoljava prema jedinjenjima koja kao metu imaju njegovu HV (Yearick i sar., 2008). Iz toga proističe važnost sagledavanja rezultata dobijenih ispitivanjem aktivnosti jedinjenja u *in vitro* sistemu i iz druge perspektive, prema nosaču koji se nalazi u bočnom lancu aminohinolina. U benzotiofenskoj grupi uočavaju se veoma ujednačeni rezultati kada se govori o aktivnosti prema Dd2 soju. Naime, svih osam benzotiofena je aktivnije od CQ prema Dd2 soju, a među njima se nalazi i jedinjenje sa najboljom aktivnošću prema ovom soju (CIAQ4, $IC_{50}=13.7$ nM). Dva tiofenska jedinjenja nisu pokazala zavidnu aktivnost prema soju 3D7 ispitivanjem u *in vitro* sistemu, dok su oba bolja od kontrole prema rezistentnom soju. Ovakav rezultat, udružen sa činjenicom da su svi tiofenski i benzotiofenski derivati ostvarili $\geq 50\%$ inhibicije rasta bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum*, navodi na zaključak da uvođenje benzotiofena i tiofena u bočni lanac aminohinolina zaista utiče na prevazilaženje parazitske rezistencije. Takođe, interesantno je da sva tri jedinjenja sa benzenom imaju relativno niske IC_{50} vrednosti prema oba soja *P. falciparum*. Ako se obrati pažnja na strukture četiri jedinjenja sa najslabijom *in vitro* aktivnošću prema Dd2 soju *P. falciparum*, koja ide do potpunog

izostanka aktivnosti, zapaža se da su među njima čak tri derivati adamantana (CIAQ2, FAQ1, FCIAQ1), dok četvrto jedinjenje pripada grupi jednostavnih struktura (FCIAQ2).

Sagledavanjem rezultata eksperimenata ispitivanja antimalarijske aktivnosti u *in vitro* sistemu, od preliminarnog skrininga svih ispitivanih aminohinolina do preciznih IC₅₀ vrednosti za pojedinačno jedinjenje koje je prošlo skrining, proisteklo je više korisnih saznanja na polju razvoja novih antimalarika. Pre svega podatak da nijedno jedinjenje iz grupe 2-aminohinolina nije vršilo $\geq 50\%$ inhibicije rasta parazita nijednog od dva ispitivana soja *P. falciparum* govori protiv nastavka rada na modifikacijama ovog prstena. Što se tiče bočnog lanca, grubo govoreći, ako se uzmu u obzir rezultati skrininga i prosečne IC₅₀ vrednosti prema oba soja *P. falciparum*, jedinjenja benzotiofenske grupe pokazuju najbolju aktivnost u *in vitro* sistemu. S obzirom na to da je veća aktivnost jedinjenja prema rezistentnom soju *P. falciparum* u odnosu na kontrolni CQ upravo ono čemu danas teže istraživačke grupe širom sveta (Ridley i sar., 1996; Madrid i sar., 2005; Sparatore i sar., 2005; Madrid i sar., 2006; Khan i sar., 2009; Opsenica i sar., 2011; Manohar i sar., 2012; Sáenz i sar., 2012; Sinha M i sar., 2014; Kondaparla i sar., 2016), naš najvredniji *in vitro* rezultat je veliki procenat jedinjenja sa upravo takvom karakteristikom (80% onih koja su prošla skrining).

Opsežna ispitivanja aktivnosti u *in vitro* model sistemu izvedena u okviru ove studije pre svega su skriningom eliminisala 40% novosintetisanih jedinjenja, a zatim su dala prvu sliku o antimalarijskoj aktivnosti 22 novosintetisana aminohinolina. Ovaj segment ispitivanja je značajan, ali se, kako je i prethodno navođeno, ne može razmatrati odvojeno od ishoda eksperimenata na životinjama koji je od suštinske važnosti (Noedl i sar., 2003).

Od 22 jedinjenja koja su na osnovu rezultata ispitivanja u *in vitro* uslovima bila određena za dalje eksperimente u *in vivo* sistemu, 19 (86.4%) je bilo dostupno za ispitivanja grube toksičnosti na zdravim ženjkama miševa soja C57Bl/6. Četiri jedinjenja (21%, 4/19) su ispoljila toksične efekte u dozi od 160 mg/kg/dan. Najveći procenat toksičnih jedinjenja (37.5%, 3/8) našao se u adamantanskoj grupi, i tri toksična derivata (AQ2, AQ3, CIAQ6) su isključena iz daljih ispitivanja. Četvrto toksično jedinjenje pripada benzotiofenskoj grupi (CIAQ3), ali s obzirom na strukturnu sličnost sa pet ostalih netoksičnih derivata ove grupe, ipak je ispitano na toksičnost i u dvostruko nižoj dozi (80

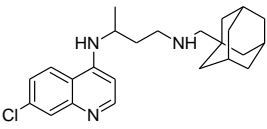
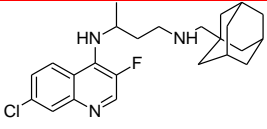
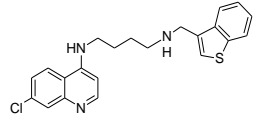
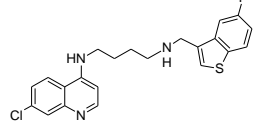
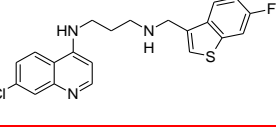
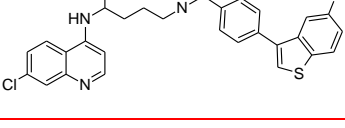
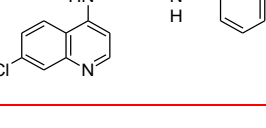
mg/kg/dan) u kojoj se pokazalo kao netoksično, te je uključeno u dalje *in vivo* eksperimente u toj dozi. Dva derivata benzena (CIAQ13, CIAQ15), jedno jedinjenje jednostavne strukture (FCIAQ2), kao i oba derivata tiofena (AQ5, CIAQ11) bili su netoksični. Treba istaći da se nijedan derivat sa fluorom na aminohinolinskom jezgru nije pokazao kao toksičan.

Čak 15 od ukupno 37 jedinjenja (40.5%) izabrano je za dalja ispitivanja u *in vivo* sistemu, od čega pet adamantana (AQ1, CIAQ1, CIAQ2, FAQ1, FCIAQ1), šest benzotiofena (CIAQ3-CIAQ5, CIAQ7-CIAQ9), jedno jedinjenje sa tiofenskim prstenom (CIAQ11), dva jedinjenja sa benzenovim prstenom (CIAQ13, CIAQ15) i jedno jedinjenje jednostavne strukture (FCIAQ2). Rezultati ukazuju na izuzetno dobru antimalarijsku aktivnost čitave ispitivane serije jedinjenja, jer su sva (15/15, 100%) primenjena u dozama od 160 mg/kg/dan i/ili 80 mg/kg/dan značajno produžila život inficiranim miševima u odnosu na netretiranu inficiranu kontrolnu grupu ($P < 0.05$). Među njima, devet jedinjenja omogućilo je samo produženo preživljavanje inficiranih životinja u odnosu na inficirane netretirane (kontrolne) miševе (AQ1, CIAQ2, CIAQ3, CIAQ7, CIAQ11, CIAQ13, CIAQ15, FAQ1, FCIAQ2). Preživljavanje bar neke inficirane jedinke do 31. dana posle infekcije ali sa rezidualnom parazitemijom ostvareno je kao rezultat tretiranja miševa sa četiri jedinjenja (CIAQ4, CIAQ5, CIAQ9, CIAQ13). Jedinjenje CIAQ13 je ispoljavalo različit efekat u zavisnosti od doze: u dozi od 80 mg/kg/dan omogućilo je produženo preživljavanje u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok je primena dvostruko veće doze omogućila preživljavanje jedne životinje do 31. dana (sa nalazom parazita u krvnom razmazu). Najzad, tri jedinjenja (CIAQ1, FCIAQ1 i CIAQ8) su u dozi od 160 mg/kg/dan izlečila sve inficirane miševa, od kojih su dva (CIAQ1 i FCIAQ1) navedeni efekat ostvarila i u dvostruko nižoj dozi. Adamantani CIAQ1 i njegov derivat sa fluorom na poziciji C(3) aminohinolinskog prstena, FCIAQ1, ispitani su i u seriji dvostruko nižih doza (40 mg/kg/dan, 20 mg/kg/dan i 10 mg/kg/dan). Efekat izlečenja izostaje sa smanjenjem terapijske doze u oba slučaja, s tim što je CIAQ1 (jedinjenje bez fluora) pokazalo aktivnost i u dozi od 10 mg/kg/dan, dok je najmanja efikasna doza fluoro derivata bila 40 mg/kg/dan.

Od gore navedenih 15 jedinjenja ističe se aktivnost sedam aminohinolina koji omogućavaju preživljavanje određenog procenta životinja do 31. dana posle infekcije sa ili bez nalaza parazita u perifernoj krvi, od čega čak šest pripada grupi CIAQ (CIAQ1, CIAQ4, CIAQ5, CIAQ8, CIAQ9, CIAQ13), dok je sedmo jedinjenje iz FCIAQ grupe (FCIAQ1). Za svih sedam jedinjenja je zajednički 4-aminohinolinski prsten supstituisan atomom hlora na poziciji C(7) (Tabela 15). Ovakav rezultat potvrđuje dosadašnje literaturne podatke koji naglašavaju značaj postojanja supstituenta upravo na ovoj poziciji u molekulu 4-aminohinolina (De i sar., 1998; Kaschula i sar., 2002; Hwang i sar., 2011). Egan i saradnici su na osnovu rezultata ispitivanja antimalarijskog potencijala grupe od 19 nosintetisanih 7-hlor-4-aminohinolina utvrdili značaj svakog pojedinačnog dela ovakve strukture za krajnji antimalarijski efekat. Naime, 4-aminohinolinski prsten je potreban za kompleksiranje sa gvožđe (III) feroprotoporfirinom, ali ne i dovoljan za inhibiciju sinteze hemozoina, već se u te svrhe uvodi atom hlora na položaj C(7), dok je aminoalkilni bočni lanac odgovoran za jaku antimalarijsku aktivnost (Egan i sar., 2000).

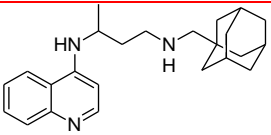
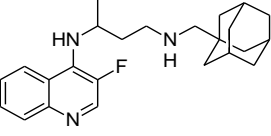
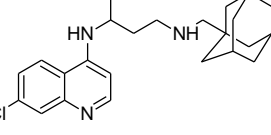
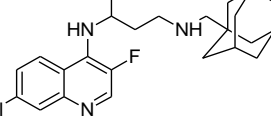
U svom revijskom radu Dola i sar. navode da su modifikacijom bočnog lanca 4-aminohinolina i to uvođenjem struktura kao što su piperazin, izohinkuklidin, triazin, gvanidin i triazol nastala jedinjenja sa dobrom antimalarijskom aktivnošću u *in vitro* sistemu i to posebno prema rezistentnim sojevima, koja se međutim nije pokazala u *in vivo* sistemu (Dola i sar., 2014). S tim u vezi, treba se osvrnuti na uticaj modifikacija bočnog lanca na ispoljenu aktivnost u *in vivo* sistemu ovde ispitivanih jedinjenja. Naime, od sedam najaktivnijih jedinjenja, dva adamantanska i jedan benzotiofenski derivat omogućili su izlečenje inficiranih životinja.

Tabela 15. Strukturne formule sedam jedinjenja sa najboljim efektom u *in vivo* sistemu

Jedinjenje	Strukturna formula	Bočni lanac
CIAQ1		Adamantan
FCIAQ1		
CIAQ8		Benzotiofen
CIAQ4		
CIAQ5		
CIAQ9		
CIAQ13		Benzen

Male promene u hemijskoj strukturi jedinjenja mogu u velikoj meri uticati na ispoljavanje aktivnosti u *in vivo* sistemu, što je ilustrovano na primeru adamantanskog 4-aminohinolina koji se našao čak u četiri ispitivane grupe (Tabela 16). Ako dva adamantanska jedinjenja iz grupa CIAQ i FCIAQ uporedimo sa jedinjenjima grupa AQ i FAQ zapaža se da izlečenje u slučaju druga dva jedinjenja izostaje i to se može pripisati nedostatku hlora na poziciji C(7). Ovim je s jedne strane potvrđeno da razlika u samo jednom atomu krucijalno menja aktivnost, dok je s druge strane važno još jednom istaći neophodnost prisustva ovog heteroatoma u jedinjenjima sa željenom antimalarijskom aktivnošću.

Tabela 16. Uporedni prikaz aktivnosti jedinjenja primenjenih u istoj dozi (80 mg/kg/dan) u *in vivo* sistemu sa i bez prisustva heteroatoma hlora na položaju C(7) aminohinolinskog jezgra

Jedinjenje	Strukturna formula	Antimalarijski efekat na miševe inficirane <i>P. berghei</i>
AQ1		produženo preživljavanje u odnosu na netretirane inficirane miševe
FAQ1		
CIAQ1		izlečenje 100% životinja
FCIAQ1		

Na osnovu rezultata eksperimenata u *in vivo* sistemima možemo zaključiti da je farmakofora 7-hlor-4-aminohinolin odgovorna za antimalarijsku aktivnost, što je u saglasnosti sa dosadašnjim literaturnim navodima (Kaur i sar., 2010), a među svim jedinjenjima sa tom strukturom su se kao najaktivniji izdvojili 7-hlor-4-aminohinolini sa adamantanom i benzotiofenom u bočnom lancu.

Analiza rezultata dobijenih u *in vivo* sistemu ne bi bila potpuna bez osvrta i na jedan tehnološki aspekt našeg istraživanja, a to je primena molekularnih metoda radi verifikacije odsustva parazitemije kod miševa koji su preživeli čitav tok eksperimenta. Naime, kod svih životinja koje su tretirane najaktivnijim jedinjenjima CIAQ1, FCIAQ1 i CIAQ8, a čiji su razmazi periferne krvi mikroskopski bili negativni na prisustvo parazita *P. berghei* na kraju eksperimenta, definicija „izlečenja“ je uključivala i odsustvo rezidualne parazitemije potvrđeno qPCR-om. Ovo predstavlja metodološko unapređenje u odnosu na slične studije jer pregledom dosadašnje literature nije uočeno da je ovakva potvrda rađena.

Sumarno, u okviru rezultata ovog istraživanja predstavljena je antimalarijska aktivnost 37 novosintetisanih aminohinolinskih jedinjenja. Od 19 jedinjenja koja su nakon opsežnih eksperimenata u *in vitro* sistemima odabrana za ispitivanje i u *in vivo* sistemu, 15 jedinjenja koja nisu pokazala znake grube toksičnosti kada se primene na životinjama ispitana su u *Thompson*-ovom testu. Svih 15 jedinjenja, primenjenih u dozi od 80 mg/kg i/ili 160 mg/kg, značajno je produžilo život tretiranih životinja inficiranih *P. berghei* u odnosu na grupu netretiranih inficiranih miševa. Još je značajnije što je treman inficiranih životinja sa čak sedam od ovih jedinjenja omogućio preživljavanje do 31. dana. Među njima su četiri (CIAQ4, CIAQ5, CIAQ9 i CIAQ13) inficiranim životinjama pružila visok stepen zaštite, iako sa rezidualnom infekcijom, dok je 100% inficiranih životinja bilo izlečeno nakon tretmana navedenim dozama jedinjenja CIAQ1 i FCIAQ1 (80 mg/kg/dan i 160 mg/kg/dan) i CIAQ8 (160 mg/kg/dan). Među jedinjenjima koja su se ispitivanjem u *in vivo* modelima pokazala kao najaktivnija našli su se derivati sa adamantanom i benzotiofenom u bočnom lancu. Sagledavanjem kompletnih rezultata proistekla su brojna značajna zapažanja.

Prvo, zapaženo je da u pojedinim slučajevima korelacija među rezultatima koji su dobijeni na osnovu ispitivanja aktivnosti jedinjenja u *in vitro* i *in vivo* sistemima izostaje, što se može ilustrovati na više primera. Jedinjenje AQ1 koje je jedino pokazalo bolju aktivnost (niske IC₅₀ vrednosti) u odnosu na kontrolni CQ prema oba soja *P. falciparum* nakon primene u *in vitro* sistemu, u *in vivo* sistemu je samo produžilo preživljavanje inficiranih tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu, tako da se nije našlo među sedam jedinjenja koja su se pokazala kao najaktivnija. Takođe, jedinjenja CIAQ4 i CIAQ5, koja su pokazala dobru aktivnost ispitivanjem u *in vitro* modelima i bila među najaktivnijim protiv soja Dd2, jesu obezbedila preživljavanje jednog broja inficiranih tretiranih životinja do 31. dana, ali bez izlečenja. Dakle, u navedenim primerima jedinjenja koja su pokazala najbolju aktivnost u *in vitro* model sistemu, nisu ostvarila najbolji efekat u *in vivo* sistemu. S druge strane, nijedno od tri jedinjenja sa fluorom na položaju C(3) aminohinolinskog jezgra nije bilo efikasnije od CQ ni prema jednom soju *P. falciparum* u *in vitro* sistemu, štaviše njihov efekat prema Dd2 soju je potpuno izostao (IC₅₀>500 nM), dok su ispitivanja u *in vivo* sistemu pokazala da su sva tri jedinjenja produžila život tretiranih inficiranih životinja, a jedno od njih, FCIAQ1, primenjeno u dve najviše doze, čak je omogućilo izlečenje svih inficiranih životinja. Diskrepanca rezultata

dobijenih ispitivanjem u *in vitro* i *in vivo* sistemima je bila i ranije prijavljivana. Guan i sar. su uočili da su karbamatni i alkilaminski derivati pirolo [3,2-f] hinazolin-1,3-diamina, uprkos lošoj efikasnosti u *in vitro* sistemu (Guan i sar., 2005), bili izuzetno efikasni prema *P. berghei* u *in vivo* sistemu. Takođe Opsenica i sar. su uočili navedenu diskrepancu za neke tiofenske i furanske aminohinoline (Opsenica i sar., 2015). Neusaglašenost rezultata dobijenih ispitivanjem u *in vitro* i *in vivo* sistemima ukazuje na to da su za antimalarijsku aktivnost ovih jedinjenja odgovorna ne ona sama nego njihovi metaboliti.

Drugo značajno zapažanje proisteklo je iz dela rezultata dobijenih na osnovu praćenja razvoja parazitemije u svakoj životinji tokom trajanja čitavog eksperimenta. Naime, uočeno je da jedinjenja CIAQ4, CIAQ5, CIAQ7, CIAQ9, CIAQ11 i FCIAQ1 u određenim dozama omogućavaju miševima da (pre)žive sa izuzetno velikim brojem parazita (59,4-86%) u razmazu periferne krvi (skoro) tokom čitavog eksperimenta. Benzotiofeni CIAQ4, CIAQ5 i CIAQ9 omogućili su preživljavanje 25-80% životinja do 31. dana, dok je jedna od pet životinja tretirana jedinjenjem CIAQ7 živela 29 dana. Tiofen CIAQ11 omogućio je preživljavanje jedne životinje do punih 27 dana kada je parazitemija iznosila čak 75%. Treba naročito istaći adamantansko jedinjenje FCIAQ1 koje je u dozi od 40 mg/kg/dan omogućilo preživljavanje životinja sa parazitemijom u rasponu 37-62%, dok je prvom višom dozom (80 mg/kg/dan) izlečeno čak 100% inficiranih životinja. Na ovom primeru zapaža se da je doza koja omogućava preživljavanje inficiranih životinja sa visokom parazitemijom zapravo suboptimalna jer je prva naredna doza omogućavala izlečenje životinja. Preživljavanje miševa sa ovako visokim parazitemijama predstavlja biološki fenomen koji smo uspeali da zapazimo zahvaljujući našem istraživačkom pristupu da se prati parazitemija svake životinje kroz sve vremenske tačke eksperimenta. Sposobnost da miševi tretirani navedenim jedinjenjima žive uz ovako neočekivano visoke nalaze parazita u razmazu periferne krvi, može da ukazuje na uticaj ispitivanih jedinjenja na parazitsku patogenost i/ili virulenciju i otvara vrata novom polju ispitivanja u cilju utvrđivanja uzroka ovog fenomena.

Zatim, dobijene rezultate posebno vezane za najaktivnija jedinjenja smo u dosadašnjem tekstu tumačili u odnosu na modifikovanu vodeću strukturu 4-aminohinolina. Međutim, isti rezultati se mogu analizirati i u odnosu na modifikaciju u bočnom lancu. Naime, tri najefikasnija aminohinolina (koji su omogućili izlječenje 100% inficiranih životinja) su u bočnom lancu imali ili adamantan (CIAQ1 i FCIAQ1) ili benzotiofen (CIAQ8), zbog čega treba razmotriti njihove strukture, poznate biološke efekte i dosadašnju upotrebu u medicinskoj hemiji. Adamantanski prsten, sastavljen od tri cikloheksanska prstena u konformaciji „stolice“, krut je i nepodložan stresu (Fort i Schleyer, 1964) a predstavlja najjednostavniji dijamondoid čija lipofilnost olakšava lekovima prolazak kroz membrane (Wanka i sar., 2013). Jedinstvena strukturalna i hemijska svojstva čine adamantan biokompatibilnim i netoksičnim, što zajedno sa niskom cenom i pristupačnošću pruža izuzetne mogućnosti za njegovo korišćenje u dizajniranju različitih sistema nosača za isporuku lekova (Štimac i sar., 2017). Derivati adamantana su zastupljeni među antivirusnim lekovima, zatim lekovima koji se koriste u terapiji različitih bolesti centralnog nervnog sistema, u terapiji kancera, a takođe su već poznata ispitivanja nekih adamantanskih derivata kao potencijalnih antimalarika (spiroadamantan peroksid, spiroadamantan-1,2,4-trioksan, spiroadamantan-1,2,4-trioksolan) (Wanka i sar., 2013), kako u *in vitro* (Šolaja i sar., 2008; Chinnapattu i sar., 2015), tako i u *in vivo* (Tripathi i sar., 2007) sistemima. S druge strane, benzotiofen je zbog svoje heterociklične strukture pogodan za sintezu većih bioaktivnih molekula (Kharb i Bansal, 2013), a širok spektar farmakoloških aktivnosti (preko 40) ovog prstena povezan je sa prisustvom atoma sumpora. Deluje antimikrobno, antitumorski, antiinflamatorno, antioksidativno, antituberkulotično, antidijabetično, antikonvulzivno (Keri i sar., 2017). Takođe, poseduje i izvesnu antimalarijsku aktivnost koja je pokazana u *in vitro* sistemu na primeru benzotiofen-2-karboksamida (Pieroni i sar., 2017), dok derivati bromo-benzotiofen karboksamida pored aktivnosti u *in vitro* modelu pokazuju aktivnost i prema *P. berghei* kada se ispituju u *in vivo* sistemima (Banerjee i sar., 2011). Izložene karakteristike ukazuju na to da su obe farmakofore pogodne za sintezu biomolekula i potvrđuju mogućnost njihove upotrebe u formulaciji lekova za humanu upotrebu.

Pristup primenjen u ovoj doktorskoj disertaciji da se u cilju utvrđivanja korelacije između rezultata dobijenih ispitivanjem u *in vitro* i *in vivo* sistemu sva jedinjenja koja su ispitivanjem u *in vitro* sistemu na bar jednom od dva ispitivana soja *P. falciparum* (3D7 i Dd2) ostvarila $\geq 50\%$ inhibicije rasta parazita, ispitaju i u *in vivo* eksperimentalnemu modelu, dozvolio nam je da uočimo terapijski potencijal koji bi bio propušten da smo izabrali uobičajeni pristup da u *in vivo* modelu ispitamo samo jedinjenja čije su IC_{50} vrednosti niže u odnosu na kontrolno jedinjenje. Ovo se pokazalo kao dobar potez, jer bismo u suprotnom izgubili dragocene podatke o tri jedinjenja sa fluorom na poziciji C(3) aminohinolinskog jezgra, koji na osnovu IC_{50} vrednosti nisu bili kandidati za ispitivanja na životinjama. Kako su ova tri jedinjenja ujedno bili jedini predstavnici derivata sa fluorom na položaju C(3) aminohinolinskog jezgra koja su ostvarila $\geq 50\%$ inhibicije rasta parazita bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum*, njihovim isključivanjem iz daljeg rada izostao bi svaki podatak o efektu fluoro derivata u *in vivo* sistemu, a posebno, izgubili bismo i jedan od najvrednijih rezultata ovog istraživanja jer se upravo među fluoro derivatima našlo jedno od tri jedinjenja koja su omogućila izlečenje miševе, FCIAQ1. Ovakvi rezultati navode na pretpostavku da je i tokom ranijih decenija bilo struktura izgubljenih upravo zbog pristupa, jer se većina istraživačkih grupa vodi principom da se samo jedinjenja koja su se ispitivanjem u *in vitro* sistemu pokazala najaktivnijim ispitaju i u *in vivo* modelima (Birrell i sar., 2003; Sparatore, 2008; Ongarora i sar., 2015; Singh S i sar., 2016; Yeo i sar., 2017).

Na kraju, treba reći nešto više o tri prethodno pomenuta jedinjenja sa fluorom na poziciji C(3) aminohinolinskog prstena. Iako jedinjenja nisu pokazala aktivnost bolju od CQ ispitivanjem u *in vitro* sistemu, primenom na životinjama nisu ispoljila toksične efekte, a svi ispitani derivati su pokazali aktivnost u *in vivo* sistemu. Štaviše, adamantanski derivat FCIAQ1 je čak obezbedio izlečenje 100% inficiranih životinja i to u dve eksperimentalne doze (160 mg/kg/dan i 80 mg/kg/dan). Ovi podaci su od izuzetne vrednosti, jer u literaturi još nije opisana antimalarijska aktivnost serije aminohinolina sa atomom fluora na ovoj poziciji. Pošto među ispitanim eksperimentalnim benzotiofenima nije postojalo nijedno jedinjenje sa atomom fluora na aminohinolinskom prstenu, izazov za dalja istraživanja jeste upravo sinteza benzotiofenskih jedinjenja koja bi na položaju C(3) aminohinolinskog prstena imala fluor, pre svega modifikacijom najefikasnijeg benzotiofena CIAQ8.

S obzirom na to da je izazivač malarije parazit koji godinama različitim mehanizmima odoleva postojećoj terapiji i da se ulažu ogromni ljudski naponi u cilju prevazilaženja parazitske rezistencije pronalaženjem inovativnih hemijskih struktura, a da idealan antimalarik još uvek nije pronađen, velika je šteta a rekli bismo i nedopustivo da ijedna struktura bude propuštena zbog pristupa. Međutim, ne postoji racionalan pristup kojim bi ovo bilo nemoguće izbeći jer nema ni apsolutnog kriterijuma na osnovu koga bi rezultati dobijenih ispitivanjem aktivnosti u *in vitro* modelu vodili pravilnom odabiru jedinjenja za dalje eksperimente na životinjama. Srivastava i sar. su sasvim nedavno pokušali da utvrde koje bi vrednosti dobijene na osnovu ispitivanja aktivnosti jedinjenja u *in vitro* modelima bile najpouzdanije za utvrđivanje korelacije sa antimalarijskom aktivnošću *in vivo*. Za svoje eksperimente u *in vitro* sistemu koristili su dva soja *P. falciparum* 3D7 (CQ^S) i K1 (CQ^R), dok je aktivnost u *in vivo* modelu ispitivana na soju *Plasmodium yoelii* (Srivastava i sar., 2017).

Opšti cilj kontrole malarije jeste proširenje arsenala postojećih struktura novom generacijom molekula koji će pored aktivnosti na nivou faze Er kao metu imati i druge životne forme ovog parazita (sporozoite, hipnozoite, gametocite). U našem istraživanju je antimalarijska aktivnost grupe novosintetisanih jedinjenja ispitana vrlo detaljno, ali samo na nivou faze Er, a ne i na nivou jetre. Međutim, u okviru istraživanja Terzić i sar. ispitana je i dokazana aktivnost jedinjenja FCIAQ1 (Tabela 3, jedinjenje 25) na nivou faze jetre, a intrahepatocitna inhibicija rasta parazita povezana je sa prisustvom atoma fluora na poziciji C(3) aminohinolinskog jezgra (Terzić i sar., 2016). Kako je u okviru ove doktorske disertacije pokazana antimalarijska aktivnost jedinjenja FCIAQ1 na nivou faze Er, zaključuje se da ovaj aminohinolin deluje na dve faze životnog ciklusa parazita malarije, što je u saglasnosti sa aktuelnim globalnim zahtevima za nove antimalarike.

Dobijeni rezultati ukazuju i na neposredne pravce daljih istraživanja. Jedinjenja CIAQ1, FCIAQ1 i CIAQ8 su pokazala izuzetnu aktivnost u *in vivo* sistemu, pa bi stoga u budućim istraživanjima bilo neophodno da se detaljno ispituju njihovi metaboliti i mehanizmi dejstva. Takođe, treba se osvrnuti i na vrlo čestu pojavu da isti lek može da se koristi u tretmanu srodnih agenasa. Tako su derivati artemizinina, koji su pre svega antimalarici, pokazali značajan efekat i prema parazitu *Toxoplasma gondii* (Dunay i sar., 2009). Vođeni činjenicama da s jedne strane rodovi *Plasmodium* i *Toxoplasma* pripadaju istom filumu *Apicomplexa*, a s druge da je ova doktorska disertacija u celosti urađena u

Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja, u okviru koga radi i Nacionalna referentna laboratorija za toksoplazmozu, buduća istraživanja mogla bi da budu usmerena na ispitivanje potencijalne antitoksoplazmatske aktivnosti najefikasnijih jedinjenja u odgovarajućim *in vitro* i *in vivo* modelima. Za ova istraživanja bi u startu bili od značaja podaci o netoksičnosti ovih jedinjenja.

Pored kliničke efikasnosti i netoksičnosti jedinjenja veoma važan faktor je proces njegove proizvodnje. Stoga je neophodno napraviti kratak osvrt na složenost eksperimentalne procedure i ekonomski aspekt prilikom sinteze tri najaktivnija jedinjenja ove grupe. Za potrebe ovog istraživanja jedinjenja su sintetisana u relativno maloj količini koja je bila dovoljna za izvođenje eksperimenata i u proseku je iznosila 100-200 mg. Treba naglasiti da je najkompleksnija sinteza derivata FClAQ1, zbog uvođenja fluora u položaj C(3) aminohinolinskog prstena, nešto jednostavnija je sinteza ClAQ1, dok se jedinjenje ClAQ8 dobija u svega dva reakciona koraka, polazeći od komercijalno dostupnog 4,7-dihlorhinolina. Za dalja istraživanja u smislu razvoja leka bila bi neophodna proizvodnja željenih jedinjenja na većoj skali. Predmet budućih istraživanja svakako bi morala da bude optimizacija reakcionih uslova, poboljšanje prinosa reakcije ili pronalaženje alternativnih pristupa sintezi, kako bi celokupan proces proizvodnje bio ekonomski isplativ.

Naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u dobijenim saznanjima koja su u svakom smislu inovativna u oblasti hemioterapije eksperimentalne malarije jer predstavljaju rezultat ispitivanja antimalarijske aktivnosti jedinjenja sintetisanih *de novo*. Tumačenjem dobijenih rezultata, odnosno analizom veze između uvedenih strukturnih modifikacija na jezgru i bočnom lancu aminohinolina i njihovog ispoljenog efekta u *in vivo* sistemu, antimalarijski potencijal se može povezati sa prisustvom atoma hlora na položaju C(7) jezgra 4-aminohinolina, dok je aktivnost dodatno unapređena uvođenjem adamantana i benzotiofena u bočni lanac. Dve pomenute farmakofore predstavljaju hemijske strukture pogodne za modifikacije aminohinolinskog bočnog lanca tako da rezultati ovog istraživanja istovremeno ukazuju i na potencijalne pravce daljih istraživanja na ovom polju.

6. ZAKLJUČCI

Ispitivanjem aktivnosti 37 novosintetisanih aminohinolina sa modifikacijama na jezgru i u bočnom lancu u uspostavljenim *in vitro* i *in vivo* model sistemima dobijeni su rezultati na osnovu kojih se može zaključiti da je u pitanju serija jedinjenja koja pokazuje izuzetnu antimalarijsku aktivnost. Ova aktivnost je posebno vezana za određene strukturne modifikacije.

Konkretno, svih 15 aminohinolinskih struktura ispitanih u *in vivo* uslovima pokazalo je efekat, među kojima su tri jedinjenja (CIAQ1, FCIAQ1 i CIAQ) dovela i do potpunog izlečenja svih inficiranih životinja.

Dodatno, na osnovu poređenja razlika u stepenu ispoljene aktivnosti u odnosu na strukturne modifikacije, izveli smo sledeće zaključke :

1. Jezgro 4-aminohinolina je pogodna osnova za buduće hemijske modifikacije, dok 2-aminohinolinsko nije. Naime, sva jedinjenja koja su na osnovu rezultata prve faze ispitivanja u *in vitro* sistemima odabrana za dalji rad u osnovi imaju 4-aminohinolinski prsten, dok se nijedno od sedam jedinjenja sa 2-aminohinolinskim jezgrom nije kvalifikovalo za titraciju do IC₅₀ vrednosti.
2. Čak 80% (18/22) jedinjenja ispitanih u *in vitro* uslovima (do preciznih IC₅₀ vrednosti) pokazuje bolju aktivnost prema rezistentnom soju *P. falciparum* u odnosu na CQ, što navodi na zaključak da proteini parazita koji su uključeni u proces preuzimanja i efluksa leka nisu prepoznali ova novosintetisana jedinjenja, što bi značilo da prevazilaze parazitsku rezistenciju i time ispunjavaju osnovni zahtev za nove antimalarike.

3. Uvođenje benzotiofena i tiofena u bočni lanac aminohinolina utiče na prevazilaženje parazitske rezistencije. Svi ispitani derivati tiofena (8/8) i benzotiofena (2/2) su pokazali bolju antimalarijsku aktivnost prema rezistentnom soju *P. falciparum* u odnosu na CQ.
4. Najbolji antimalarijski efekat u *in vivo* sistemu pokazala su jedinjenja sa 4-aminohinolinskim prstenom supstituisanim atomom hlora na položaju C(7), što navodi na zaključak da je za efekat aminohinolina neophodno postojanje 7-hlor-4-aminohinolinskog jezgra.
5. Adamantan i benzotiofen predstavljaju farmakofore pogodne za modifikovanje bočnog lanca aminohinolina u cilju povećanja antimalarijske aktivnosti što je potvrđeno rezultatom da se među tri jedinjenja koja leče 100% inficiranih životinja nalaze dva adamantanska (CIAQ1 i FCIAQ1) i jedan benzotiofenski (CIAQ8) derivat aminohinolina.
6. Biološki fenomen da jedinjenja CIAQ4, CIAQ5, CIAQ7, CIAQ9, CIAQ11 i FCIAQ1 omogućavaju miševima da žive sa izuzetno visokim stepenom parazitemije u perifernoj krvi (59,4-86%) ukazuje na njihov uticaj na patogenost parazita *P. berghei*, što predstavlja osnovu za dalja ispitivanja mehanizma dejstva ovih struktura.
7. Odsustvo korelacije između rezultata dobijenih ispitivanjima aktivnosti eksperimentalnih jedinjenja u *in vitro* i *in vivo* sistemima navodi na pretpostavku da su za *in vivo* antimalarijsku aktivnost pre svega odgovorni metaboliti ispitivanih jedinjenja. Naime, jedino jedinjenje koje je na oba soja *P. falciparum* bilo aktivnije od CQ u *in vitro* modelu (AQ1) nije pokazalo najbolju aktivnost u *in vivo* sistemu. Nasuprot ovome, jedinjenje koje u *in vitro* sistemu nije pokazalo aktivnost prema rezistentnom soju *P. falciparum* u *in vivo* uslovima (FCIAQ1) omogućilo je i to čak u dve različite doze dovelo do izlečenja svih inficiranih životinja.

Najzad, pored navedenih činjenica koje su od suštinskog značaja za dalje eksperimentalne modifikacije aminohinolina treba istaći i tehnički zaključak koji je proistekao iz ovde primenjenog eksperimentalnog dizajna:

8. Nestandardni pristup primenjen u okviru ove doktorske disertacije da se *in vivo* ispituju sva jedinjenja koja su ispitivanjem u *in vitro* sistemu inhibirala rast $\geq 50\%$ parazita bar jednog od dva ispitivana soja *P. falciparum* obezbedio je da nijedan rezultat ne bude propušten zbog potencijalne diskrepance između rezultata u *in vitro* i *in vivo* sistemima, i time potvrdio da ne postoji apsolutna korelacija između rezultata dobijenih u *in vitro* i *in vivo* sistemu.

Svi izvedeni zaključci jasno pokazuju da su ovim opsežnim istraživanjem dobijeni podaci značajni za dalje strukturne modifikacije aminohinolina, čime predstavljaju jednu malu kariku u dugačkom lancu pronalaženja idealnog antimalarika a time i dragoceni doprinos znanju u oblasti hemioterapije malarije.

7. LITERATURA

- Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. (2011): Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J*, 10, 144, doi: 10.1186/1475-2875-10-144.
- Adjei GO, Goka BQ, Binka F, Kurtzhals JAL (2009): Artemether–lumefantrine: an oral antimalarial for uncomplicated malaria in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7(6): 669-681.
- Ager AL (1984). Experimental models: rodent malaria models (*in vivo*). In: Peters W, Richards WHG (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology: Antimalarial Drugs*, New York: Springer Verlag. p. 225-54.
- Aguiar ACC, da Rocha EMM, de Souza NB, França TCC, Krettli AU (2012): New approaches in antimalarial drug discovery and development - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 107(7): 831-45.
- Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, et al. (2007): PfMDR and resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg*, 76(4): 641–647.
- Alout H, Roche B, Dabire RK, Cohuet A (2017): Consequences of insecticide resistance on malaria transmission. *PLoS Pathogens*, 13(9): e1006499.
- Andriopoulos P, Economopoulou A, Spanakos G, Assimakopoulos G (2013): A local outbreak of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Laconia, Greece: a re-emerging infection in the southern borders of Europe? *Int J Infect Dis*, 17(2): e125–8.
- Anthony MP, Burrows JN, Duparc S, Moehrle J, Wells TN (2012): The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar J*, 11, 316, doi: 10.1186/1475-2875-11-316.
- Arama C, Troye-Blomberg M (2014): The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *J Intern Med*, 275(5): 456-66.
- Armengaud A, Legros F, D’Ortenzio E, Quatresous I, Barre H, Houze S, et al. (2008): A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. *Travel Med Infect Dis*, 6(1-2): 36-40.
- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. (2014): Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 371(5): 411–23.

- Ballou WR (2009): The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite Immunol.* 31(9):492-500. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01143.x.
- Banerjee T, Kapoor N, Surolia N, Surolia A (2011): Benzothiophene carboxamide derivatives as novel antimalarials. *IUBMB Life*, 63(12): 1111-5.
- Barber BE, Grigg MJ, William T, Yeo TW, Anstey NM (2017): The treatment of *Plasmodium knowlesi* malaria. *Trends Parasitol*, 33(3): 242 – 53.
- Basco LK (2007): Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: *World Health Organization*.
- Birrell GW, Chavchich M, Ager AL, Shieh HM, Heffernan GD, Zhao W, et al. (2003): JPC-2997, a new aminomethylphenol with high *in vitro* and *in vivo* antimalarial activities against blood stages of *Plasmodium*. *Wien Klin Wochenschr*, 115 Suppl 3, 23-7.
- Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, Kirk K, Fidock DA (2005): Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol Microbiol*, 56(2): 323–33.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA (2013): Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 26th ed. McGraw-Hill. p. 727-731.
- Bunnag D, Harinasuta T, Pinichpongse S, Suntharasamai P (1980): Effect of primaquine on gametocytes of *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Lancet*, 2(8185): 91.
- Burrows JN, van Huijsduijnen RH, Möhrle JJ, Oeuvray C, Wells TNC (2013): Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar J*, 12, 187, doi: 10.1186/1475-2875-12-187.
- Carrara VI, Lwin KM, Phyo AP, Ashley E, Wiladphaingern J, Sriprawat K, et al. (2013): Malaria burden and artemisinin resistance in the mobile and migrant population on the Thai–Myanmar Border, 1999–2011: An Observational Study. *PLoS Med*, 10(3): e1001398.
- Carvalho RCC, Martins WA, Silva TP, Kaiser CR, Bastos MM, Pinheiro LCS, et al. (2016): New pentasubstituted pyrrole hybrid atorvastatin–quinoline derivatives with antiplasmodial activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 26(8): 1881–4.

- Casagrande M, Barteselli A, Basilico N, Parapini S, Taramelli D, Sparatore A (2012): Synthesis and antiplasmodial activity of new heteroaryl derivatives of 7-chloro-4-aminoquinoline. *Bioorg Med Chem*, 20(19): 5965-79.
- Centers for Disease Control and Prevention. Malaria, Geographical distribution. CDC (2017): Available at <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>.
- Cheruku SR, Maiti S, Dorn A, Scorneaux B, Bhattacharjee AK, Ellis WY, Vennerstrom JL (2003): Carbon isosteres of the 4-aminopyridine substructure of chloroquine: effects on pKa, hemozoin binding, inhibition of hemozoin formation, and parasite growth. *J Med Chem*, 46(14): 3166-9.
- Chinnapattu M, Sathiyarayanan KI, Iyer PS (2015): Synthesis and biological evaluation of adamantane-based aminophenols as a novel class of antiplasmodial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 25(4): 952-5.
- Chou AC, Chevli R, Fitch CD (1980): Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry*, 19(8): 1543-9.
- Churcher TS, Lissenden N, Griffin JT, Worrall E, Ranson H (2016): The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. *Elife*, 5: e16090. doi: 10.7554/eLife.16090.
- Coatney GR, Collins WE, Warren M, et al. *Plasmodium knowlesi*. In: Coatney GR, editor. The primate malarias. Washington: U.S. Government Printing Office, 1971. p. 317-33.
- Cooper RA, Ferdig MT, Su XZ, Ursos LM, Mu J, Nomura T, et al. (2002): Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*, 61(1): 35-42.
- Cowman AF, Healer J, Marapana, Marsh K (2016): Malaria: biology and disease. *Cell*, 167(3): 610-24.
- Dakić Z, Kulišić Z, Stajković N, Pelemiš M, Čobeljić M, Stanimirović Z, et al. (2008): Ecology of *Anopheles* mosquitoes in Belgrade area: Estimating vector potential for malaria retransmission. *Acta Vet*, 58(5-6): 603-14.
- Dakić Z, Pelemiš M, Djurković-Djaković O, Lavadinović L, Nikolić A, Stevanović G, et al. (2011): Imported malaria in Belgrade, Serbia, between 2001 and 2009. *Wien Klin Wochenschr*, 123 Suppl. 1: 15-9.

- Dakić Z, Ivović V, Pavlović M, Lavadinović L, Marković M, Djurković-Djaković O (2014): Clinical significance of molecular methods in the diagnosis of imported malaria in returning travelers in Serbia. *Int J Infect Dis*, 29: 24-30.
- D'Alessandro U, Buttiens H (2001): History and importance of antimalarial drug resistance. *Trop Med Int Health*, 6: 845-8.
- Danis K, Baka A, Lenglet A, Van Bortel W, Terzaki I, Tseroni M, et al. (2011): Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011. *Euro Surveill*, 16(42): 1-5.
- Das S, Chakraborty SP, Hati AK, Roy S (2013): Malaria treatment failure with novel mutation in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (pfdhfr) gene in Kolkata, West Bengal, India. *Int J Antimicrob Agents*, 41(5): 447-51.
- De D, Krogstad FM, Byers LD, Krogstad DJ (1998): Structure–activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *J Med Chem*, 41(25): 4918-26.
- de Villiers KA, Marques HM, Egan TJ (2008): The crystal structure of halofantrine–ferriprotoporphyrin IX and the mechanism of action of arylmethanol antimalarials. *J Inorg Biochem*, 102(8): 1660-7.
- Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, et al. (2006a): Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health*, 11(9): 1360–6.
- Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegardh N, Yi P, Top SN, et al. (2006b): Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop Med Int Health*, 11: 1800-7.
- Divo AA, Geary TG, Jensen JB (1985): Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob Agents Chemother*, 27(1): 21-7.
- Dola VR, Kondaparla SR, Katti SB (2014): Recent developments in the side chain modified 4-aminoquinolines as antimalarial agents. *Chem Biol*, 4(4): 206-22.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. (2009): Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 361(5): 455–67.

- Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Jaquet C, Vennerstrom JL, Ridley RG (1998): An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol*, 55(6): 727–36.
- Dunay IR, Chan WC, Haynes RK, Sibley LD (2009): Artemisone and artemiside control acute and reactivated toxoplasmosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(10): 4450–6.
- Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre JF, Jesic ZZ, Le Bras J (2001): Analysis of pfcr1 point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 114(1): 95–102.
- Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. (2003): Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424(6951): 957–61.
- Egan TJ, Hunter R, Kaschula CH, Marques HM, Misplon A, Walden J (2000): Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of beta-hematin formation, and antiplasmodial activity. *J Med Chem*, 43(2): 283–291.
- Feachem RG, Phillips AA, Targett GA, Snow RW (2010): Call to action: priorities for malaria elimination. *Lancet*, 376(9752): 1517–21.
- Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. (2000): Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*, 6(4): 861–71.
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S (2004): Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov*, 3(6): 509–20.
- Flannery EL, Chatterjee AK, Winzeler EA (2013): Antimalarial drug discovery: approaches and progress towards new medicines. *Nat Rev Microbiol*, 11(12): 849–62.
- Foquet L, Hermsen CC, van Gemert G, Van Braeckel E, Weening KE, Sauerwein R, et al. (2014): Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Invest*, 124(1): 140–4.
- Fort RC, Schleyer PyonR (1964): Adamantane: Consequences of the diamondoid structure. *Chem Rev*, 64(4): 277–300.
- Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg D (1997): Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 51: 97–123.

- Frosch AE, Venkatesan M, Laufer MK (2011): Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data. *Malar J*, 10, 116, doi: 10.1186/1475-2875-10-116.
- Gladwin M., Trattler B, Mahan CS (2014): Clinical microbiology made ridiculously simple, 6th ed. Miami: MedMaster.
- Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB (1990): Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(8): 2931–5.
- Grassi B. Studi di uno Zoologo Sulla Malaria. Rome. 1900.
- Guan J, Zhang Q, O'Neil M, Obaldia III N, Ager A, Gerena L, Lin AJ (2005): Antimalarial activities of new pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(12): 4928, doi 10.1128/AAC.49.12.4928-4933.2005.
- Guiguemde WA, Shelat AA, García-Bustos JF, Diagana TT, Gamo FJ, Guy RK (2012): Global phenotypic screening for antimalarials. *Chem Biol*, 19(1): 116–29.
- Gunderson JH, McCutchan TF, Sogin ML (1986): Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene expressed in the bloodstream stages of *Plasmodium berghei*: evolutionary implications. *J Protozool*, 33(4): 525-9.
- Henry M, Alibert S, Rogier C, Barbe J, Pradines B (2008): Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. *Curr Top Med Chem*, 8(7): 563-78.
- Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE (2015): The march toward malaria vaccines. *Vaccine*, 33 (Suppl 4): D13–D23.
- Hott A, Tucker MS, Casandra D, Sparks K, Kyle DE (2015): Fitness of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*, 70(10): 2787–96.
- Hovlid ML, Winzeler EA (2016): Phenotypic screens in antimalarial drug discovery. *Trends Parasitol*, 32(9): 697-707.
- Hwang JY, Kawasuji T, Lowes DJ, Clark JA, Connelly MC, Zhu F, et al. (2011): Synthesis and evaluation of 7-substituted 4-aminoquinoline analogs for antimalarial activity. *J Med Chem*, 54(20): 7084–93.

- Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. (2017): The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis*, 17(5): 491-7.
- Jani D, Nagarkatti R., Beatty W, Angel R, Slebodnick C, Andersen J, et al. (2008): HDP—A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. *PLOS Pathogens*, 4(4): 1-15.
- Jiménez-Díaz MB, Viera S, Ibáñez J, Mulet T, Magán-Marchal N, Garuti H, et al. (2013): A new *in vivo* screening paradigm to accelerate antimalarial drug discovery. *PLoS One*, 8(6): e66967.
- Jiménez-Díaz MB, Viera S, Alvaro EF, Angulo-Barturen I (2014): Animal models of efficacy to accelerate drug discovery in malaria. *Parasitology*, 141(1): 93-103.
- Jonkman A, Chibwe RA, Khoromana CO, Liabunya UL, Chaponda ME, Kandiero GE, et al. (1995): Cost-saving through microscopy-based versus presumptive diagnosis of malaria in adult outpatients in Malawi, *Bull World Health Organ*, 73(2): 223-7.
- Kampen H, Proft J, Etti S, Maltezos E, Pagonaki M, Maier WA, Seitz HM (2003): Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: epidemiological aspects. *Parasitol Res*, 89(4): 252–8.
- Kantele A, Jokiranta TS (2011): Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis*, 52(11): 1356-62.
- Kaschula CH, Egan TJ, Hunter R, Basilico N, Parapini S, Taramelli D, et al. (2002): Structure–activity relationships in 4-aminoquinoline antiplasmodials. The role of the group at the 7-Position. *J Med Chem*, 45(16): 3531-9.
- Kaur K, Jain M, Reddy RP, Jain R (2010): Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur J Med Chem*, 45(8): 3245-64.
- Keri RS, Chand K, Budagumpi S, Balappa Somappa S, Patil SA, Nagaraja BM (2017): An overview of benzo[b]thiophene-based medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*, 138: 1002-33.
- Khan MOF, Levi MS, Tekwani BL, Khan SI, Kimura E, Borne RF (2009): Synthesis and antimalarial activities of cyclen 4-aminoquinoline analogs. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(4): 1320–4.

- Kharb R, Bansal K (2013): Perspectives on antimicrobial potential of benzothiophene derivatives. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 4(2): 1585-606.
- Kondaparla S, Soni A, Manhas A, Srivastava K, Puri SK, Katti SB (2016): Antimalarial activity of novel 4-aminoquinolines active against drug resistant strains. *Bioorg Chem*, 70: 74-85.
- Konstantinović J, Videnović M, Srblijanović J, Djurković-Djaković O, Bogojević K, Sciotti R i Šolaja BA (2017): Antimalarials with benzothiophene moieties as aminoquinoline partners. *Molecules*, 22 (3): 343, doi:10.3390/molecules22030343.
- Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RAG, Wirima JJ, Kazembe PN, et al. (2003): Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, 187(12): 1870-5.
- Landau I, Gautret P (1998). Animal models rodents. In *Malaria parasite, pathogenesis and Protection* (ed. Sherman, I.W.), pp. 401–417. ASM Press, Washington, DC.
- Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, et al. (2006): Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med*, 355(19): 1959-66.
- Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalama FK, Stine OC, Taylor TE, Plowe CV (2010): Return of chloroquine-susceptible falciparum malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis*, 202(5): 801-8.
- Laveran A: Un nouveau parasite trouvé dans le sang de malades atteints de fièvre palustre. Origine parasitaire des accidents de l'impaludisme (1881): *Bull Mém Soc Méd Hôpitaux Paris*, 17: 158-164.
- Leang R, Barrette A, Bouth DM, Menard D, Abdur R, Duong S, Ringwald P (2013): Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(2): 818-26.
- Madrid PB, Sherrill J, Liou AP, Weisman JL, Derisi JL, Guy RK (2005): Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 15(4): 1015-8.
- Madrid PB, Liou AP, DeRisi JL, Guy RK (2006): Incorporation of an intramolecular hydrogen-bonding motif in the side-chain of 4-aminoquinolines enhances activity against drug-resistant *P. falciparum*. *J Med Chem*, 49(15): 4535–43.

- Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ (1993): Parasite lactate-dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug-sensitivity. *Am J Trop Med Hyg*, 48(6): 739-41.
- Makler MT, Palmer CJ, Ager AL (1998): A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 92(4): 419-33.
- Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner MA, Thomson, Jr. RB, et al. (2005): Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp.* *J Clin Microbiol*, 43(5): 2435–40.
- Manohar S, Rajesh UC, Khan SI, Tekwani BL, Rawat DS (2012): Novel 4-aminoquinoline-pyrimidine based hybrids with improved *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. *ACS Med Chem Lett*, 3(7): 555-9.
- Markwalter CF, Davis KM, Wright DW (2016): Immunomagnetic capture and colorimetric detection of malarial biomarker *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *Analytical Biochemistry*, 493: 30-4, doi: 10.1016/j.ab.2015.10.003.
- Marra F, Salzman JR, Ensom MHH (2003): Atovaquone–proguanil for prophylaxis and treatment of malaria. *Ann Pharmacother*, 37(9): 1266 – 75.
- Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI, Howitt SM, Bröer S, Kirk K (2009): Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science*, 325(5948): 1680–2.
- Martin SK, Oduola A, Milhous WK (1987): Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*, 235(4791): 899-901.
- Matuschewski K (2017): Vaccines against malaria - still a long way to go. *FEBS J*, 284(16): 2560-8.
- Meshnick SR (1997): Why does Quinine still work after 350 years of use?. *Parasitol Today*, 13(3): 89-90.
- Millar SB, Cox-Singh J (2015): Human infections with *Plasmodium knowlesi* - zoonotic malaria. *Clin Microbiol Infect*, 21(7): 640–8.
- Mishra M, Mishra VK, Kashaw V, Iyer AK, Kashaw SK (2017): Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug discovery. *Eur J Med Chem*, 125: 1300-20.

- Mokgethi-Morule T, N'Da DD (2016): Cell based assays for anti-*Plasmodium* activity evaluation. *Eur J Pharm Sci*, 84: 26-36, doi: 10.1016/j.ejps.2016.01.001.
- Moody A (2002): Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev*, 15(1): 66-78.
- Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF (2002): One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 66(5): 503-8.
- Noedl H, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Looareesuwan S, Miller R., Wongsrichanalai C (2003): Malaria drug-susceptibility testing. HRP2-based assays: current data, future perspectives. *Wien Klin Wochenschr*, 115 (Suppl. 3): 23–7.
- Nsanzabana C, Rosenthal PJ (2011): *In vitro* activity of antiretroviral drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(11): 5073-7.
- Ongarora DSB, Strydom N, Wicht K, Njoroge M, Wiesner L, Egan TJ, Wittlin S i sar. (2015): Antimalarial benzoheterocyclic 4-aminoquinolines: Structure-activity relationship, *in vivo* evaluation, mechanistic and bioactivation studies. *Bioorg Med Chem*, 23(17): 5419-32.
- O'Neill PM, Bray PG, Hawley SR, Ward SA, Park KB (1998): 4 - aminoquinolines - past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol Ther*, 77(1): 29-58.
- O'Neill PM, Ward SA, Berry NG, Jeyadevan JP, Biagini GA, Asadollaly E, et al. (2006): A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem*, 6(5): 479-507.
- O'Neill PM, Barton VE, Ward SA (2010): The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. *Molecules*, 15(3): 1705–21.
- Opsenica I, Burnett JC, Gussio R, Opsenica D, Todorović N, Lanteri CA, et al. (2011): A chemotype that inhibits three unrelated pathogenic targets: the botulinum neurotoxin serotype A light chain, *P. falciparum* malaria, and the *Ebola* filovirus. *J Med Chem*, 54(5): 1157-69.
- Opsenica IM, Tot M, Gomba L, Nuss JE, Sciotti RJ, Bavari S, et al. (2013): 4-amino-7-chloroquinolines: probing ligand efficiency provides botulinum neurotoxin serotype A light chain inhibitors with significant antiprotozoal activity. *J Med Chem*. 56(14): 5860-71.

- Opsenica IM, Verbić TŽ, Tot M, Sciotti RJ, Pybus BS, Djurković-Djaković O, et al. (2015): Investigation into novel thiophene- and furan-based 4-amino-7-chloroquinolines afforded antimalarials that cure mice. *Bioorg Med Chem*, 23(9): 2176-86.
- Payne D (1987): Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 3: 241-6.
- Payne D (1988): Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*, 66(5): 621-6.
- Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL (2007): Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 6(1): 29-40.
- Pereira DA, Williams JA (2007): Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol*, 152(1): 53–61.
- Peters W. Resistance in human malaria IV (1987): 4-aminoquinolines and multiple resistance. *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. Vol 2. London: Academic Press, :659–786.
- Peters W, Robinson BL (1999). Malaria. In: Zak O, Sande MA, editors. *Handbook of animal models of infection*. London: Academic Press. 757–773.
- Pieroni M, Azzali E, Basilico N, Parapini S, Zolkiewski M, Beato C, et al. (2017): Accepting the invitation to open innovation in malaria drug discovery: synthesis, biological evaluation, and investigation on the structure–activity relationships of benzo[b]thiophene-2-carboxamides as antimalarial agents. *J Med Chem*, 60(5): 1959-70.
- Poluga J, Milošević I, Jordović J, Dakić Z, Lavadinović L, Stevanović G, et al. (2016): Clinical characteristics of imported malaria: An 11-year experience in a Serbian referral center. *J Infect Dev Ctries*, 10(7): 770-6.
- Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ (2014): Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 14(10): 982-91.
- Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chantra A, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ (2004): Activities of artesunate and primaquine against asexual-and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4): 1329–34.

- Ranson H, Lissenden N (2016): Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol*, 32(3): 187–96.
- Redd SC, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG, Heymann DL (1996): Transplacental transmission of *Plasmodium falciparum* in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, 55 (1 Supplement): 57-60.
- Rénia L, Goh YS (2016): Malaria Parasites: The Great Escape. *Front Immunol*, 7(463): eCollection 2016.
- Ridley RG, Hofheinz W, Matile H, Jaquet C, Dorn A, Masciadri R, et al. (1996): 4-aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(8): 1846–54.
- Ridley RG (2002): Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415 (6872): 686–93.
- Romi R, Boccolini D, Menegon M, Rezza G (2012): Probable autochthonous introduced malaria cases in Italy in 2009–2011 and the risk of local vector-borne transmission. *Euro Surveill*, 17(48): 2009-12.
- Rosenthal PJ (2003): Review Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol*, 206 (Pt 21): 3735-44.
- Rougemont M, van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatón K (2004): Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*, 42(12): 5636-43.
- Sáenz FE, Mutka T, Udenze K, Oduola AMJ, Kyle DE (2012): Novel 4-aminoquinoline analogs highly active against the blood and sexual stages of *Plasmodium in vivo* and *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(9): 4685-92.
- Santa-Olalla Peralta P, Vazquez-Torres MC, Latorre-Fandós E, Mairal-Claver P, Cortina-Solano P, Puy-Azón A, et al. (2010): First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Euro Surveill*, 15(41): 19684.
- Sauerwein RW, Roestenberg M, Moorthy VS (2011): Experimental human challenge infections can accelerate clinical malaria vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 11(1): 57-64.

- Schlesinger PH, Krogstad DJ, Herwaldt BL (1988): Antimalarial agents: mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*, 32(6): 793–8.
- Schuster FL (2002): Cultivation of *Plasmodium spp.* *Clin Microbiol Rev*, 15(3): 355-64.
- Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF i sar. (2001): Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*, 17(12): 582–8.
- Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al. (2004): A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363 (9414): 1017–24.
- Singh K, Agarwal A, Khan SI, Walker LA, Tekwani BL (2007): Growth, drug susceptibility, and gene expression profiling of *Plasmodium falciparum* cultured in medium supplemented with human serum. *J Biomol Screen*, 12(8): 1109-14.
- Singh S, Agarwal D, Sharma K, Sharma M, Nielsen MA, Alifrangis M, et al. (2016): 4-Aminoquinoline derivatives: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity against chloroquine-resistant parasites. *Eur J Med Chem*, 122: 394-407.
- Sinha M, Dola VR, Agarwal P, Srivastava K, Haq W, Puri SK, Katti SB (2014): Antiplasmodial activity of new 4-aminoquinoline derivatives against chloroquine resistant strain. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(14): 3573-86.
- Sinha S, Sarma P, Sehgal R, Medhi B (2017): Development in assay methods for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing a systematic review. *Front Pharmacol*, 8:754, doi: 10.3389/fphar.2017.00754.
- Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P (2013): The open access malaria box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One*, 8(6): e62906.
- Sparatore A, Basilico N, Parapini S, Romeo S, Novelli F, Sparatore F, Taramelli D (2005): 4-Aminoquinoline quinolizidinyl- and quinolizidinylalkyl-derivatives with antimalarial activity. *Bioorg Med Chem*, 13(18): 5338-45.
- Sparatore A, Basilico N, Casagrande M, Parapini S, Taramelli D, Brun R, et al. (2008). Antimalarial activity of novel pyrrolizidinyl derivatives of 4-aminoquinoline. *Bioorganic Med Chem Lett*, 18(13): 3737-40.

- Spencer HC (1985): Drug-resistant malaria - changing patterns mean difficult decisions. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6): 748–58.
- Srivastava K, Agarwal P, Soni A, Puri SK (2017): Correlation between *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of compounds using CQ-sensitive and CQ-resistant strains of *Plasmodium falciparum* and CQ-resistant strain of *P. yoelii*. *Parasitol Res*, 116(7): 1849-54.
- Stephens JWW (1922): A new malaria parasite of man. *Ann Trop Med Parasitol*, 16: 383-8.
- Stocks PA, Raynes KJ, Ward SA (2001): Novel quinoline antimalarials. In: Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery (ed. P. J. Rosenthal), Totowa, NJ: Humana Press, pp. 235-253.
- Šolaja BA, Opsenica D, Smith KS, Milhous WK, Terzić N, Opsenica I, et al. (2008): Novel 4-aminoquinolines active against chloroquine-resistant and sensitive *P. falciparum* strains that also inhibit botulinum serotype A. *J Med Chem*, 51(15): 4388-91.
- Štimac A, Šekutor M, Mlinarić-Majerski K, Frkanec L, Frkanec R (2017): Adamantane in drug delivery systems and surface recognition. *Molecules*, 22(2): pii: E297. doi: 10.3390/molecules22020297.
- Tamimi NMA, Ellis P (2009): Drug development: from concept to marketing! *Nephron Clin Pract*, 113:c125–31, doi: 10.1159/000232592.
- Tatem AJ, Jia P, Ordanovich D, Falkner M, Huang Z, Howes R, et al. (2017): The geography of imported malaria to non-endemic countries: a meta-analysis of nationally reported statistics. *Lancet Infect Dis*, 17(1): 98-107.
- ter Kuile F, White NJ, Holloway P, Pasvol G, Krishna S (1993): *Plasmodium falciparum* *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp Parasitol*, 76(1): 85–95.
- Terzić N, Konstantinović J, Tot M, Burojević J., Djurković-Djaković O, Srbijanović J, et al. (2016): Reinvestigating old pharmacophores: Are 4-aminoquinolines and tetraoxanes potential two-stage antimalarials? *J Med Chem*, 59(1): 264-81.
- Thu AM, Phyto AP, Landier J, Parker DM, Nosten FH (2017): Combating multi-drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *FEBS J*, 284(16): 2569-78.

- Trager W, Jensen JB (1976): Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254): 673-5.
- Trape JF, Legros F, Ndiaye P, Konate L, Bah IB, Diallo S, et al. (1989): Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 83: 761.
- Travassos MA, Laufer MK (2009): Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacological and clinical considerations. *Pediatr Res*, 65(5 Pt 2): 64R-70R.
- Tripathi R, Mishra D, Rizvi A, Singh C (2007): Evaluation of some adamantane-based synthetic trioxanes against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkeys. *Life Sci*, 81(21-22): 1544-8.
- Tukulula M, Njoroge M, Abay ET, Mugumbate GC, Wiesner L, Taylor D, et al. (2013): Synthesis and *in vitro* and *in vivo* pharmacological evaluation of new 4-aminoquinoline-based compounds. *ACS Med Chem Lett*, 4(12): 1198-202.
- Tuteja R (2007): Malaria - an overview. *FEBS J*, 274(18): 4670-9.
- Vadivelan M, Dutta TK (2014): Recent advances in the management of *Plasmodium knowlesi* infection. *Trop Parasitol*, 4(1): 31-4.
- Vajs V, Jokić A, Milosavljević S (2017): Artemisinin story from the Balkans. *Nat Prod Commun*, 12(8): 1157-60.
- Verma R, Khanna P, Chawla S (2013): Malaria vaccine can prevent millions of deaths in the world. *Hum Vaccin Immunother*, 9(6): 1268-71.
- Waknine-Grinberg JH, Hunt N, Bentura-Marciano A, McQuillan JA, Chan H, Chan W, Barenholz Z i sar. (2010): Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malar J*, 9: 227, doi: 10.1186/1475-2875-9-227.
- Wanka L, Iqbal K, Schreiner PR (2013): The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chem Rev* 113(5): 3516-604.
- Warhurst DC (1986): Antimalarial drugs: mode of action and resistance. *J Antimicrob Chemother*, 18, Issue Supplement B, 51-9.
- Wein S, Maynadier M, Tran Van Ba C, Cerdan R, Peyrottes S, Fraisse L, Vial H (2010): Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J Clin Microbiol*, 48(5): 1651-60.

- Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ (1991): Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(8): 3382–6.
- Wellems TE, Plowe CV (2001): Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*, 184(6): 770-6.
- Wells TNC, van Huijsduijnen RH, Voorhis WCV (2015): Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov*, 14(6): 424-42.
- White LJ, Flegg JA, Phyto AP, Wiladpai-ngern JH, Bethell D, Plowe C, et al. (2015): Defining the *in vivo* phenotype of artemisinin-resistant falciparum malaria: a modelling approach. *PLoS Med*, 12(4): e1001823.
- White NJ (2008): *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*, 46(2): 172–3.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM (2014): Malaria. *Lancet*, 383(9918): 723-35.
- White NJ (2016): Can new treatment developments combat resistance in malaria?. *Expert Opin Pharmacother*, 17: 1303–07.
- World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria, 3rd edition: WHO (2015). Available at <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
- World Health Organization. World Malaria Report 2017. Geneva, Switzerland: WHO (2017). Available at <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/en/>
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR (2002): Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*, 2(4): 209–18.
- Yearick K, Ekoue-Kovi K, Iwaniuk DP, Natarajan JK, Alumasa J, de Dios AC, et al. (2008): Overcoming drug resistance to heme-targeted antimalarials by systematic side chain variation of 7-chloro-4-aminoquinolines. *J Med Chem*, 51(7): 1995-8.
- Yeo SJ, Liu DX, Kim HS, Park H (2017): Anti-malarial effect of novel chloroquine derivatives as agents for the treatment of malaria. *Malar J*, 16(1): 80.

PRILOZI

Biografija

Jelena Srbljanović je rođena 23. decembra 1987. god. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i XIV beogradsku gimnaziju. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (UB) 2011. god. sa srednjom ocenom 9,45. Šk. 2011/12. god. upisala je na istom fakultetu doktorske studije, studijski program: Farmaceutska mikrobiologija. Nakon obavljenog jednogodišnjeg farmaceutskog staža 2012. god. je položila državni ispit.

Od 1. avgusta 2013. god. zaposlena je kao istraživač pripravnik u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja (IMI) UB, a 3. decembra 2015. god. izabrana je u zvanje istraživač saradnik. Angažovana je na tekućem projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i bilateralnom projektu sa Francuskom „Pavle Savić“. Takođe je bila angažovana na projektu „Organizacija doktorskih seminara 2016/17“ finansiranog od strane Univerzitetske agencije za Frankofoniju (saradnja Univerziteta iz Francuske, Rumunije i Srbije).

Pohađala je edukativni kurs savremene epidemiologije u Antverpenu, Belgija u okviru TD1302 COST akcije (2014. god.). Kao dobitnik FEMS granta aktivno je učestvovala na FEMS- simpozijumu „*Emerging infections*“, 6th Congress of Macedonian Microbiologists with international participation, održanom na Ohridu, Makedonija (2018. god.).

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila 13 bibliografskih jedinica. Pet radova je objavljeno *in extenso*, od čega dva u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti, dva u vrhunskim međunarodnim časopisima i jedan u međunarodnom časopisu. Od radova štampanih u izvodu, pet su saopštenja sa međunarodnog naučnog skupa, a tri sa skupa nacionalnog značaja.

Dobitnik je nagrade za mlade naučnike (*Young Scientist Award*) Evropske federacije parazitologa za rad „*The antimalarial potential of novel aminoquinolines enhanced by adamantane as a carrier*“ prezentovan na *European Multicolloquium of Parasitology XII*, u Turkuu, Finska (2016.god.) i dve godišnje nagrade (2017. god.), Društva parazitologa Srbije za najbolji rad i Naučnog veća IMI za najbolji naučnoistraživački rad mladog istraživača „Dr Vera i dr Dušan Kentera“; obe za rad objavljen u časopisu *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Član je Društva parazitologa Srbije.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Jelena Srbljanović

Broj indeksa: 23/11

Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Ispitivanje antimalarijskog potencijala novosintetisanih aminohinolina
u *in vitro* i *in vivo* sistemima“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis doktoranda



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Srbljanović

Broj indeksa: 23/11

Studijski program: Farmaceutska mikrobiologija

Naslov rada: „Ispitivanje antimalarijskog potencijala novosintetisanih aminohinolina u *in vitro* i *in vivo* sistemima“

Mentori: Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor; dr *Olgica Đurković-Daković*, naučni savetnik

Potpisani: Jelena Srbljanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stanicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis doktoranda



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom

**„Ispitivanje antimalarijskog potencijala novosintetisanih aminohinolina
u *in vitro* i *in vivo* sistemima“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu,

Potpis doktoranda



1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerade.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerade. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.