

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**  
**УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА**  
**КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ**

**Предмет:** Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације Јелене Рупар

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 07. 09. 2023. године, Одлуком 01. број 2135/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата маг. фарм. Јелене Рупар, под насловом:

**„Синтеза, електрохемијско испитивање интеракција са ДНК и *in vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина“**

у следећем саставу:

1. Др сц. Јасмина Брборић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. Др сц. Владимир Добричић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др сц. Александра Јаношевић Лежаић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
4. Др сц. Јелена Граховац, виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије

Ментори:

Др сц. Оливера Чудина, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Мара Алексић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Комисија у наведеном саставу прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи Извештај:

## ИЗВЕШТАЈ

### 1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација под називом „Синтеза, електрохемијско испитивање интеракција са ДНК и *in vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина“ садржи 8 поглавља: 1. Увод, 2. Циљ рада, 3. Експериментални део, 4. Резултати и дискусија, 5. Закључак, 6. Литература, 7. Прилози и 8. Биографија. На почетку докторске дисертације приложени су сажети на српском и енглеском језику, садржај и листа скраћеница, а на крају се налази одговарајући прилог докторској дисертацији: списак публикованих радова и саопштења који чине део докторске дисертације, кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

Дисертација је написана на 177 страна, са једноструким проредом, јасним и прегледним стилем и садржи 100 слика и 14 табела. Преглед литературе садржи 212 навода.

- **Увод** докторске дисертације садржи 7 поглавља која описују основне теоријске принципе на којима се заснива експериментални рад у овој дисертацији. У првом поглављу, описан је развој деривата акридина кроз историју. Такође, описани су механизми дејства акридина и фактори који утичу на антибактеријску, антивирусну, антималаријску и антитуморску активност, са посебним освртом на однос структуре и антитуморске активности акридина. У другом поглављу, описана је структура ДНК. Наведене су и основне функције ДНК молекула. У трећем делу, описан је ћелијски циклус, кроз приказ процеса који се одвијају током интерфазе и деобе, затим је описано дејство топоизомеразе II, ензима који може да мења топологију ДНК. У овом делу објашњена је ћелијска смрт кроз јасно раздвајање процеса некрозе и апоптозе. У четвртм делу, описан је поступак синтезе аминокиселинских деривата акридина који је преузет из литературе. У петом делу, описани су процеси који се могу пратити применом волтаметријских техника, објашњен је појам електрохемијске ћелије и наведене су функције електрода (радне, референтне и помоћне). У оквиру овог поглавља описане су и циклична, диференцијално пулсна и волтаметрија правоугаоних таласа, методе које су коришћене у експерименталном раду у овој дисертацији. У шестом поглављу, описани су ДНК биосензори, са посебним освртом на електрохемијске ДНК биосензоре. У седмом поглављу, описана је примена молекулског *docking*-а како би се испитала интеракција лиганда са циљним молекулом.

- Основни **циљ** докторске дисертације (описан кроз 8 потциљева) био је синтеза нових аминокиселинских деривата акридина са потенцијалном антитуморском активношћу, затим *in vitro* испитивање њихове антитуморске активности, као и електрохемијско испитивање интеракција најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата акридина са ДНК. Први потциљ се односи на синтезу аминокиселинских деривата акридина, која је обухватала избор полазних аминокиселина, оптимизацију услова синтезе, саму синтезу од полазног једињења 9-хлороакридина, пречишћавање и карактеризацију новосинтетисаних једињења применом спектроскопских метода (IR, MS/MS, <sup>1</sup>H NMR и <sup>13</sup>C NMR, HRMS), као и одређивањем температуре топљења. Други потциљ се односи на одређивање *in vitro* антитуморске активности новосинтетисаних аминокиселинских деривата акридина, кроз одређивање цитотоксичности МТТ тестом, анализу ћелијског циклуса применом проточне цитометрије и анализу ћелијске смрти применом проточне цитометрије. Трећи потциљ обухвата испитивање везивања синтетисаних једињења за ДНК применом теста електрофоретске покретљивости. Четврти потциљ обухвата испитивање инхибиторне активности синтетисаних једињења на хуману ДНК-топоизомеразу II $\alpha$ . Пети потциљ односи се на електрохемијско испитивање редукције и оксидације 9-хлороакридина (једињења које је коришћено као полазно једињење за синтезу аминокиселинских деривата акридина) и

најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата акридина (АДА) применом волтаметријских метода: цикличне волтаметрије (CV), волтаметрије правоугаоних таласа (SWV) и диференцијално пулсне волтаметрије (DPV). Шести потциљ обухвата електрохемијско испитивање везивања 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних АДА за ДНК применом волтаметрије правоугаоних таласа. Седми потциљ се односи на електрохемијско одређивање константе везивања 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних АДА за ДНК. Осми потциљ се односи на примену *docking* анализе за испитивање интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних АДА са ДНК.

- **Експериментални део** рада описан је кроз осам поглавља. У првом поглављу, наведени су реагенси и растварачи коришћени за синтезу и физичко-хемијска испитивања, испитивање антитуморске активности и електрохемијска испитивања. У другом поглављу, наведени су опрема и програми коришћени за синтезу и физичко-хемијска испитивања, испитивање антитуморске активности, електрохемијска испитивања и молекулски *docking*. У трећем поглављу, описан је поступак синтезе, пречишћавања и физичко-хемијске карактеризације АДА. У четвртном поглављу, описан је поступак *in vitro* испитивања антитуморске активности кроз опис чувања коришћених ћелијских линија и описан је поступак извођења МТТ теста. У овом поглављу представљен је и поступак извођења клоногеног есеја, као и поступак извођења проточне цитометрије која је коришћена за анализу ћелијског циклуса и анализу ћелијске смрти. У петом поглављу, описано је испитивање електрофоретске покретљивости. У шестом поглављу, представљен је тест за одређивање инхибиторне активности синтетисаних једињења на хуману ДНК топоизомеразу П $\alpha$ . У седмом поглављу, описани су поступци за припрему раствора, припрему електроде, као и параметри за електрохемијска мерења. Такође, у овом поглављу, описана је припрема ДНК биосензора за електрохемијско испитивање интеракције синтетисаних једињења (најактивнијих аминокиселинских деривата акридина) са ДНК. У осмом поглављу, описано је извођење *docking* анализе.

**Резултати и дискусија** представљени су јасно, коришћењем оригиналних графичких и табеларних приказа (80 слика и 14 табела). Резултати су груписани у седам поглавља. У првом поглављу, описан је општи поступак синтезе АДА, приказане су структуре и номенклатура синтетисаних једињења. У другом поглављу, представљена је физичко-хемијска карактеризација синтетисаних аминокиселинских деривата акридина. У овом поглављу представљени су резултати добијени применом следећих метода: одређивања температуре топљења, IR спектрометрије, NMR спектрометрије ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), тандем масене спектрометрије (MS/MS) и масене спектрометрије високе резолуције. У оквиру другог поглавља, представљена је HPLC метода за испитивање чистоће синтетисаних АДА. У трећем поглављу представљени су и дискутовани резултати *in vitro* испитивања антитуморске активности АДА и јасно су издвојена најактивнија једињења која показују IC $_{50}$  вредност сличну или нижу у поређењу са амсакрином. Применом проточне цитометрије за најактивнија једињења приказани су резултати испитивања утицаја на фазе ћелијског циклуса, тј. одређено је у којој фази ћелијског циклуса једињења доводе до застоја. У овом поглављу представљени су и дискутовани резултати анализе ћелијске смрти. У четвртном поглављу, представљени су резултати испитивања електрофоретске покретљивости комплекса једињења и ДНК. У петом поглављу, представљени су резултати испитивања инхибиторне активности најактивнијих АДА на хуману ДНК-топоизомеразу П $\alpha$ . У шестом поглављу, представљени су резултати испитивања електрохемијског понашања 9-хлороакридина и најактивнијих АДА применом цикличне, диференцијално пулсне и волтаметрије правоугаоних таласа. Оптимизовани су услови за формирање вишеслојног ДНК биосензора. У шестом поглављу, описано је и испитивање интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих АДА са ДНК. У овом делу одређен је и концентрациони профил и представљене су и дискутоване константе везивања најактивнијих АДА. Такође, одређена је

константа везивања 9-хлороакридина за ДНК. У седмом поглављу, представљена је примена *docking* анализе за испитивање интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих АДА са ДНК.

- У поглављу **Закључак** наведени су најзначајнији закључци који произлазе из резултата истраживања и који су у складу са постављеним циљевима.
- У поглављу **Литература** наведено је 212 референци.

## 2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати ове докторске дисертације представљени су у складу са постављеним циљевима и подељени су у седам поглавља.

У првом поглављу, описан је општи поступак коришћен за синтезу АДА у коме су, од полазног једињења 9-хлороакридина, кроз двостепени поступак синтезе, зависно од коришћене аминокиселине или естра аминокиселине и одговарајућег алкооксида, добијени АДА са различитим алифатичним и ароматичним супституентима у положају 9. Синтетисани су следећи АДА: (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-фенилпропаноат (1), (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1*H*-имидазол-4-ил)пропаноат (2), (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропаноат (3), (*S*)-2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропанска киселина (4), метил-8-(акридин-9-ил-амино)октаноат (5), етил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат (6), пропил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат (7), етил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат (8), пропил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат (9), етил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат (10) и пропил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат (11). Приноси реакција представљени су такође у првом поглављу.

У другом поглављу су представљени резултати физичко-хемијске карактеризације АДА, тј. потврђена је структура синтетисаних једињења применом методе одређивања температуре топљења, IR спектрометрије, NMR спектрометрије (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), тандем масене спектрометрије (MS/MS) и масене спектрометрије високе резолуције. У овом поглављу представљене су структуре синтетисаних АДА. За свако једињење наведене су компоненте реакционе смеше приликом синтезе, компоненте мобилне фазе коришћене у танкослојној хроматографији приликом пречишћавања и описан је добијени производ. Резултати су представљени и кроз графички приказ <sup>1</sup>H NMR и <sup>13</sup>C NMR спектра једињења. Део другог поглавља чини и HPLC анализа АДА са табеларним приказом постигнуте чистоће синтетисаних АДА.

У трећем поглављу, представљени су и дискутовани резултати *in vitro* испитивања антитуморске активности АДА на канцерским и здравим ћелијским линијама, у поређењу са амсакрином – дериватом акридина са познатом антитуморском активношћу. Резултати су добијени применом МТТ теста и представљени као IC<sub>50</sub> вредности. Одређени су најпотентнији инхибитори у МТТ тесту, тј. најактивнији АДА, једињења 6, 7, 8 и 9. Клоногеним есејом потврђена је цитотоксичност ових једињења. У трећем поглављу, описана је и анализа фаза ћелијског циклуса. За најпотентније АДА, применом проточне цитометрије и одређивањем садржаја ДНК, испитан је утицај на фазе ћелијског циклуса. Утврђено је да једињења 7 и 9 доводе до застоја ћелијског циклуса у G2/M фази. У овом поглављу представљени су и резултати анализе ћелијске смрти. Применом проточне цитометрије утврђено је да једињења 6, 7, 8 и 9 индукују апоптозу.

У четвртном поглављу, представљени су резултати електрофоретског теста покретљивости са циљем испитивања потенцијала најактивнијих АДА и амсакрина да директно ступе у интеракцију са дволанчаном ДНК. Сва једињења показала су интеракцију са ДНК.

У петом поглављу, представљени су и дискутовани резултати испитивања инхибиторне активности најактивнијих АДА на хуману ДНК-топоизомеразу П<sub>α</sub>. Најактивнији АДА имали су IC<sub>50</sub> вредности блиске IC<sub>50</sub> вредностима за амсакрин, и у складу

са тим, закључено је да најактивнији АДА своје дејство могу испољити и као инхибитори хумане ДНК-топоизомеразе Па.

У шестом поглављу, приказани су резултати електрохемијског испитивања 9-хлороакридина и најактивнијих АДА применом цикличне, диференцијално пулсне и волтаметрије правоугаоних таласа. 9-хлороакридин подлеже ирверзибилним, рН-зависним и дифузионо контролисаним процесима оксидације и редукције на електроди од стакластог угљеника. Најактивнији АДА подлежу ирверзибилним процесима оксидације и редукције, при чему је уочено да присуство супституената у положају 9 утиче на отежане процесе оксидације и редукције најактивнијих АДА у поређењу са 9-хлороакридином. У шестом поглављу, представљени су и експериментално одређени оптимални услови за формирање вишеслојног ДНК биосензора (рН, време сушења капи, концентрација ДНК, запремина капи, амплитуда пулса и фреквенција), уз потврду поновљивости поступка формирања биосензора и стабилности биосензора, применом волтаметрије правоугаоних таласа. У овом поглављу представљени су и дискутовани резултати испитивања интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих АДА са ДНК применом електрохемијског ДНК биосензора. Показано је, посматрајући положај и интензитет струје пика који описује оксидацију дезоксиаденозина, да је тип интеракције највероватније интеркалација. У овом поглављу одређена је и константа везивања 9-хлороакридина и најактивнијих АДА за ДНК. За једињење 7 уочена је јака интеракција, као и за једињење 9, док су за једињења 6 и 8 одређене константе везивања имале мање вредности, тј. интеракције са ДНК су слабије. Осим наведеног, уочено је да стехиометријски однос може бити различит, зависно од концентрације супстанце која интерагује са ДНК.

У седмом поглављу, представљени су резултати *docking* студија који су потврдили резултате добијене применом волтаметрије правоугаоних таласа, тј. да се интеракција 9-хлороакридина и једињења 6, 7, 8 и 9 са ДНК остварује услед интеркалације једињења између база ДНК.

### **3. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА ДИСЕРТАЦИЈЕ СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ**

У оквиру поглавља Резултати и дискусија, добијени резултати истраживања су детаљно анализирани и разматрани уз преглед доступних литературних података.

Прегледом литературе, уочено је да се последњих година објављује већи број научних радова који описују хемијске методе синтезе нових антитуморских агенаса, деривата акридина, имајући у виду нежељене ефекте, резистенцију и лошу биорасположивост доступних антитуморских лекова [1]. Квантитативном анализом структуре и активности (QSAR) 9-анилиноакридина са антитуморском активношћу (узимајући у обзир инхибиторну активност на туморске ћелије и везивање за ДНК) доказано је да на везивање молекула утичу стерни ефекти, док хидрофобност утиче на приступ једињења активном месту [2]. Дужина бочног ланца је важна за активност деривата акридина, како за цитотоксичну активност акридинил-амино киселина и њихових метил естара [3], тако и за антипролиферативну активност и везивање за ДНК деривата код којих је за акридинско језгро везан фенил остатак одговарајућим линкером (бочним ланцем различите дужине) [4]. Модификацијом једињења која у структури садрже акридинско језгро, у литератури је наведено да је могуће синтетисати једињења која имају антитуморску активност већу од доксорубицина (стандарда) [5]. У оквиру једне публикације [6] која је део ове дисертације представљени су резултати модификованог поступка синтезе аминокиселинских деривата акридина [3]. У овој дисертацији успешно су синтетисани аминокиселински деривати акридина са ароматичним и алифатичним супституентима у положају 9, чија је структура потврђена применом методе одређивања температуре топљења, IR спектрометрије, NMR спектрометрије ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), тандем масене спектрометрије (MS/MS) и масене спектрометрије високе резолуције. Синтетисана су једињења: (S)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-фенилпропаноат (1), (S)-метил 2-(акридин-9-

ил-амино)-3-(1*H*-имидазол-4-ил)пропаноат (2), (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропаноат (3), (*S*)-2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропанска киселина (4), метил-8-(акридин-9-ил-амино)октаноат (5), етил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат (6), пропил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат (7), етил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат (8), пропил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат (9), етил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат (10) и пропил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат (11). До сада, у литератури не постоје подаци да су наведена једињења синтетисана.

Са циљем испитивања антитуморске активности, а у складу са литературним подацима, у овој дисертацији изведени су МТТ тест (одређена је  $IC_{50}$  вредност синтетисаних једињења), као и клоногени есеј [7, 8]. Како се у литератури приликом испитивања новосинтетисаних једињења, као контролно једињење користи једињење са познатом антитуморском активношћу, у овој дисертацији коришћен је амсакрин [9]. Резултати представљени у публикацији [6] указују да су једињења 6, 7, 8 и 9 са линеарним алифатичним бочним ланцима најпотентнији инхибитори у МТТ тесту на ћелијским линијама K562, A549 и MRC5, са  $IC_{50}$  вредностима испод 20  $\mu$ M, што је упоредиво или ниже у односу на амсакрин. Ови подаци у складу су са подацима које су приказали аутори *Lyakhov* и сарадници [3] за структурно слична једињења. Једињења 8 и 9 била су посебно ефикасна на ћелијску линију аденокарцинома плућа A549 ( $IC_{50} \approx 6 \mu$ M). Ово је од посебне важности, с обзиром да се амсакрин не може користити у терапији канцера плућа услед неодговарајуће антитуморске активности [10]. Клоногеним есејом је потврђена цитотоксичност за ова једињења. Испитан је утицај синтетисаних једињења на фазе ћелијског циклуса применом проточне цитометрије [11] и на тип ћелијске смрти [12]. За једињења 7 и 9, показано је да доводе до застоја у G2/M фази, док је у овој дисертацији за амсакрин, као што је већ у литератури објављено [13], показано да доводи до застоја у S фази [13]. Добијени резултати у складу су са подацима доступним у литератури, где се наводи да је G2/M заустављање уочено за акридине или друге класе једињења која делују или као отрови топоизомеразе или као инхибитори топоизомеразе који могу обухватити и друге циљне молекуле и механизме [14-19]. Применом проточне цитометрије, испитан је утицај најактивнијих АДА на тип ћелијске смрти и за једињења 6, 7, 8 и 9 закључено је да је најважнији узрок смањења преживљавања ћелија индукција апоптозе.

Тестом електрофоретске покретљивости потврђено је да најактивнији АДА интерагују са ДНК.

Испитивање инхибиторне активности на хуману ДНК топоизомеразу  $\Pi\alpha$ , показало је да једињења 6, 7, 8 и 9 показују сличну инхибиторну активност на хуману ДНК топоизомеразу  $\Pi\alpha$  у поређењу са амсакрином. Аутори *Chourpa* и *Manfait* су објавили студију која је разјаснила природу интеракције инхибитора топоизомеразе (амсакрина) са ДНК [19], у којој се наводи да се приликом интеракције формира терцијарни комплекс амсакрин-ДНК-топоизомеразе  $\Pi$ , али и да сам амсакрин може реаговати само са топоизомеразом  $\Pi$ . У складу са овим резултатима и резултатима објављеним у овој дисертацији, донет је закључак да најактивнији АДА своје дејство могу испољити и као инхибитори хумане ДНК-топоизомеразе  $\Pi\alpha$  што је представљено у публикацији [6].

Како је ДНК живих ћелија један од делова ћелије са континуалним преносом електрона, приликом интеракције једињења са ДНК може се применом електрохемијских техника одредити да ли је трансфер електрона олакшан или отежан, те донети закључак о интеракцији једињења са ДНК. Уочен је значајан допринос електрохемије, нарочито волтаметрије и електрохемијских ДНК биосензора, приликом испитивања редокс понашања и интеракције са ДНК доступних, али и новосинтетисаних једињења [20, 21]. У овој дисертацији су успешно примењене циклична волтаметрија, диференцијално пулсна волтаметрија и волтаметрија правоугаоних таласа за опис редокс процеса 9-хлороакридина и најактивнијих АДА. У литератури постоје радови који приказују примену ових техника за испитивање електрохемијског понашања деривата аминокридина као антитуморских агенаса [22]. Такође, коњугати триазол-акридина испитивани су електрохемијски, применом

наведене три технике, са циљем одређивања редокс механизма [23]. Од посебног је значаја опис редокс понашања 9-хлороакридина представљен у публикацији [24], с обзиром да је раније у литератури наведено да се може користити као прекурсор за синтезу деривата акридина са антитуморском активношћу [3] и да је исти и у овој дисертацији коришћен као прекурсор за АДА. Претходно нису објављени резултати испитивања редокс понашања овог једињења. Електрохемијско понашање 9-хлороакридина представљено је кроз процесе оксидације и редукције који су описани као иреверзибилни, рН зависни и дифузионо контролисани процеси у публикацији [24] која је део докторске дисертације. Слично 9-хлороакридину, једињења 6, 7, 8 и 9 подлежу иреверзибилним, дифузионо контролисаним процесима оксидације и редукције на електроди од стакластог угљеника, што је објављено у публикацији [25] која је део дисертације.

У литератури постоје резултати UV-VIS спектрофотометријског, флуориметријског, електрофоретског, као и електрохемијског испитивања интеракције молекула ДНК са различитим молекулама [26]. Електрохемијски ДНК биосензори користе се често за испитивање интеракција различитих молекула и ДНК применом различитих електрода [27, 28, 29]. Тако је амсакрин, као представник деривата акридина са потенцијалном антинеопластичном активношћу, испитиван применом ДНК биосензора и детектован у узорцима хуманог серума и урина [21]. Интеракција хибридног молекула који се састоји из акридинског прстена и тиофена са ДНК испитивана је применом биосензора и утврђен је тип интеракције [30]. Иако је диференцијално пулсна волтаметрија најшире коришћена метода [31, 32], у овој дисертацији коришћена је волтаметрија правоугаоних таласа за испитивање интеракције 9-хлороакридина [24] и најактивнијих АДА [25] са ДНК, јер има одређене предности у односу на диференцијално пулсну волтаметрију захтева мање времена, показује бољу поновљивост и мањи однос сигнал/шум [33]. Електрохемијско испитивање интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК је извршено применом ДНК биосензора и волтаметрије правоугаоних таласа на електроди од стакластог угљеника. Показано је да 9-хлороакридин интерагује са ДНК, да је тип интеракције највероватније интеркалација. Једињења 6, 7, 8 и 9, према електрохемијским резултатима показују интеракцију са ДНК, при чему је тип интеракције, као и код 9-хлороакридина, највероватније интеркалација. Према литературним подацима, интеракција која се заснива на интеркалацији, окарактерисана је великим вредностима константе везивања  $K$ , углавном између  $10^4$  и  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , док ниже вредности  $K$  указују на слабије интеракције, као што је везивање за жљоб или електростатичке интеракције [34]. Одређена је вредност константе везивања 9-хлороакридина за ДНК,  $K = 3,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , што указује на јаку интеракцију. Константа везивања једињења 7 за ДНК била је  $8,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  при опсегу концентрација реда величине  $10^{-7} \text{ M}$ , док је са порастом концентрације једињења 7, вредност константи везивања била нижа. За једињење 9, израчуната вредност константе била је већа од  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , што је указивало на јаку интеракцију, док су једињења 6 и 8 показала слабију интеракцију са ДНК, а вредности константи везивања биле су мање од  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . У највећем броју објављених радова одређен је стехиометријски однос 1:1 [34, 35]. Резултати представљени у овој дисертацији недвосмислено указују да стехиометријски однос може бити различит, зависно од концентрације супстанце која интерагује са ДНК [25]. До сада није испитивана интеракција једињења са ДНК у тако широком опсегу концентрација као што је приказано у овој дисертацији, такође, податак да је стехиометријски однос различит од 1:1 приликом интеракције деривата акридина са ДНК није до сада објављен.

У публикацијама [24] и [25] представљени су резултати *docking* студија изведених у складу са литературним подацима [36], који су потврдили резултате добијене применом волтаметрије правоугаоних таласа, а то је да се интеракција 9-хлороакридина и једињења 6, 7, 8 и 9 са ДНК остварује услед интеркалације наведених једињења између база ДНК.

## LITERATURA

- [1] de Almeida SM, Lafayette EA, da Silva LP, Amorim CA, de Oliveira TB, Ruiz AL, de Carvalho JE, de Moura RO, Beltrão EI, de Lima Mdo C and de Carvalho Júnior L B. (2015). Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 13023–13042. doi: 10.3390/ijms160613023
- [2] Gao H, Denny WA, Garg R, Hansch C. (1998). Quantitative structure-activity relationships (QSAR) for 9-anilino- acridines: a comparative analysis. *Chemico-Biological Interaction*, 116 (3), 157-180. doi: 10.1016/S0009-2797(98)00085-4
- [3] Lyakhov SA, Suveyzdis YI, Bykhovskaya OV, Isko NM, Andronati SA, Litvinova LA. (1997). Biological active acridine derivatives. 3. Acridinylaminoacids and their esters: synthesis and cytostatic activity. *Pharmazie*, 52 (7), 560-561. doi:10.1002/chin.199746202
- [4] Lang X, Li L, Chen Y, Sun Q, Wu Q, Liu F, Tan C, Liu H, Gao C, Jiang Y. (2013). Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis inducing antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 4170-4177. doi:10.1016/j.bmc.2013.05.008
- [5] Abdullah AAS, Awad HM, El-Sayed IE-T, El Gokha AA. (2020) Synthesis and antiproliferative activity of new hybrids bearing neocryptolepine, acridine and  $\alpha$ -aminophosphonate scaffolds. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17, 1211-1221. doi: <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01849-2>
- [6] Rupar J, Dobričić V, Grahovac J, Radulović S, Skok Ž, Ilaš J, Aleksić M, Brborić J, Čudina O. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives, *RSC Med. Chem.*, 2020, 11, p 378
- [7] Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65(1-2), 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- [8] Wang S, Sakhatskyy P, Chou T-HW, Lu S. Assays for the assessment of neutralizing antibody activities against Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) associated coronavirus (SCV), *Journal of Immunological Methods*, 301 (2005) 21-30. doi: doi:10.1016/j.jim.2005.03.008
- [9] Cain BF, Atwell GJ. The experimental antitumour properties of three congeners of three congeners of the acridylmethanesulphonanilide (AMSA) series. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1974, 10, p 539–549
- [10] Samson MK, Fraile RJ, Baker LH, Cummings G, Talley RW. Phase II study of AMSA in lung cancer, *Cancer. Treat. Rep.* 1981, 65, p 655-658.
- [11] Sherr CJ. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. 60(14) 3689–3695.
- [12] Žlender V. (2006). Detekcija apoptoze. *Arh. Hig. Rada Toksikol*, 57, 229-236
- [13] Oniščenko Anatolij I, Tkačenko AS, Kalašnik JM, Zubov PM, Gorbač TV, Babijčuk LjA, Nakonečna OA. Razlikovanje modaliteta ćelijske smrti leukocita korišćenjem protočne citometrije kod bolesnika sa hroničnim rinosinuzitisom bez nazalnih polipa. *Medicinski časopis*, 2019, 53, 2, p 43-48. doi: 10.5937/mckg53-17381
- [14] Manguera VM, Batista TM, Brito MT, Sousa TKG, Cruz RMDD, Abrantes RA, Veras RC, Medeiros IA, Medeiros KKP, Pereira ALDC, Serafim VL, Moura RO, Sobral MV. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. *Biomed. Pharmacother*, 2017, 90, p 253–261. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.049
- [15] Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2003, 99, p 167–181. doi: 10.1016/s0163-7258(03)00058-5
- [16] Chang L, Liu X, Wang D, Ma J, Zhou T, Chen Y, Sheng R, Hu Y, Du Y, He Q, Yang B, Zhu H. Hypoxia-targeted drug Q6 induces G2-M arrest and apoptosis via poisoning Topoisomerase II under hypoxia. *PLoS One*, 2015, 10, e0144506. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144506>
- [17] Schmidt F, Knobbe CB, Frank B, Wolburg H, Weller M. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. *Oncol. Rep.*, 2008, 19, p 1061–1066. doi: <https://doi.org/10.3892/or.19.4.1061>



- [18] Clifford B, Beljin M, Stark MG, Taylor WR. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res.*, 2003, 63,p 4074–4081.
- [19] Chourpa I, Manfait M. Specific molecular interactions of acridine drugs in complexes with topoisomerase II and DNA. SERS and resonance Raman study of m-AMSA in comparison with o-AMSA. *J. Raman Spectrosc*, 1995, 26,p 813–819.doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.1250260831>
- [20] Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM. (2010). DNA-electrochemical biosensors: AFM surface characterisation and application to detection of in situ oxidative damage to DNA. *Comb. Chem. High. T. Scr.*, 13, 628–640. doi: <https://doi.org/10.2174/1386207311004070628>
- [21] Javar HA, Garkani-Nejad Z, Noudeh GD, Mahmoudi-Moghaddam H. (2020). Development of a new electrochemical DNA biosensor based on Eu<sup>3+</sup>-doped NiO for determination of amsacrine as an anti-cancer drug: Electrochemical, spectroscopic and docking studies. *Anal. Chim. Acta*, 1133, 48–57. doi: 10.1016/j.aca.2020.07.071
- [22] Chiorcea-Paquim A-M, Rodrigues Pontinha AD, Oliveira-Brett AM. (2015). Quadruplex-targeting anticancer drug BRACO-19 voltammetric and AFM characterization. *Electrochimica Acta*, 174, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.05.146>
- [23] Rodrigues Pontinha AD, Sparapani S, Neidle S, Oliveira-Brett AM. (2013). Triazole–acridine conjugates: Redox mechanisms and in situ electrochemical evaluation of interaction with double-stranded DNA. *Bioelectrochemistry*, 89, 50–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.08.005>
- [24] Rugar J, Aleksić MM, Dobričić V, Brborić J, Čudina O. An electrochemical study of 9-chloroacridine redox behavior and its interaction with double-stranded DNA, *Bioelectrochemistry*, 2020, 135, 107579
- [25] Rugar J, Dobričić V, Brborić J, Čudina O, Aleksić MM. Square wave voltammetric study of interaction between 9-acridinyl amino acid derivatives and DNA. *Bioelectrochemistry*, 2023, 149, 108323.
- [26] González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA, Ribelles P, Ramos MT, Menéndez JC. (2011). An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors, in: M.A. Komorowska, S. Olsztyńska-Janus (Eds.), *Biomed. Eng. Trends, Res. Technol. InTechOpen*, London, 65–90. <https://doi.org/10.5772/13586>.
- [27] Vyskočil V, Blašková M, Hájková A, Horáková E, Krejčová Z, Stávková K, Wang J. (2012). Electrochemical DNA biosensors – useful diagnostic tools for the detection of damage to DNA caused by organic xenobiotics (A Review). *Sens. Electroanal.*, 7, 141–162
- [28] Aleksić MM, Kapetanović V. (2014). An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA - drug interactions. *Acta Chim. Slov.*, 61, 555–573.
- [29] Aleksić MM, Kapetanović V. (2013). Electrochemical biosensors as a tool for the investigation of DNA structure, damage and interaction with other molecules. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology* 11 (1), 27-43. doi: 10.2298/FUPCT1301027A
- [30] Untiveros KL, Da Silva EG, De Abreu FC, Da Silva-Júnior EF, De Araújo-Junior JX, De Aquino TM, Armas SM, De Moura RO, Mendonça-Junior FJ, Serafim VL, et al. (2019). An electrochemical biosensor based on Hairpin-DNA modified gold electrode for detection of DNA damage by a hybrid cancer drug intercalation. *Biosens. Bioelectron.* 133, 160–168. doi: 10.1016/j.bios.2019.02.071
- [31] Bruzaca EES, Lopes IC, Silva EHC, Carvalho PAV, Tanaka AA. (2017) Electrochemical oxidation of the antitumor antibiotic mitomycin C and in situ evaluation of its interaction with DNA using a DNA-electrochemical biosensor. *Microchemical Journal*, 133, 81-89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.030>
- [32] Machini WBS, Fernandes IPG, Oliveira-Brett AM. (2019). Antidiabetic Drug Metformin Oxidation and in situ Interaction with dsDNA Using a dsDNA-electrochemical Biosensor. *Electroanalysis*, 31, 1– 12. doi: 10.1002/elan.201900162
- [33] Dogan-Topal B, Ozkan SA, Uslu B. (2010). The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. *Open Chem. Biomed. Methods J.*, 3, 56–73. doi: <https://doi.org/10.2174/1875038901003010056>.

[34] Ramotowska S, Ciesielska A, Makowski M. What can electrochemical methods offer in determining DNA–drug interactions?. *Molecules*.2021, 26, 3478. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26113478>

[35] Sochr J, Nemčková K, Černicová M, Campbell K, Milata V, Farkašová D, Labuda J. DNA Interaction with 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol Studied Using Electrochemical Biosensors and Biosensing in Solution, *Electroanalysis*. 2019, 31, p 1961–1968. doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201900091>

[36] Dobričić V, Marković B, Milenković N, Savić V, Jačević V, Rančić N, Čudina O. (2014). Design, Synthesis, and Local Anti-Inflammatory Activity of 17 $\beta$ -Carboxamide Derivatives of Glucocorticoids . *Arch Pharm (Weinheim)*, 347(11), 786–797. doi:10.1002/ardp.201400165

#### 4. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РАДОВИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

*Научни радови објављени у врхунским међународним часописима*

**M21**

1. **Rupar J**, Aleksić MM, Dobričić V, Brborić J, Čudina O. An electrochemical study of 9-chloroacridine redox behavior and its interaction with double-stranded DNA. *Bioelectrochemistry*, 2020, 135, 107579. (IF (2020) = 5,373; *Biochemistry & Molecular biology* (77/296) M21
2. **Rupar J**, Dobričić V, Brborić J, Čudina O, Aleksić MM. Square wave voltammetric study of interaction between 9-acridinyl amino acid derivatives and DNA. *Bioelectrochemistry*, 2023, 149, 108323. (IF (2021) = 5,760; *Biochemistry & Molecular biology* (81/297) M21

*Научни радови објављени у истакнутим међународним часописима*

**M22**

1. **Rupar J**, Dobričić V, Grahovac J, Radulović S, Skok Ž, Ilaš J, Aleksić M, Brborić J, Čudina O. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives, *RSC Med. Chem.*, 2020, 11, 378 (назив часописа раније: *Med. Chem. Comm*, IF (2020) = 3,597, *Chemistry, Medicinal* (30/63) M22)

*Саопштења на међународним скуповима штампана у целини:*

**M33**

1. **Pantić J**, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Electrochemical oxidation and interaction of 9-chloroacridine with DNA at glassy carbon electrode. *Physical Chemistry 2016*, 13<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 26-30, 2016, Belgrade, Serbia, *Proceedings* 383-386.
2. **Rupar J**, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Application of electrochemical biosensor for investigation of acridine derivatives – DNA interaction. *Physical Chemistry 2018*, 14<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-28, 2018, Belgrade, Serbia, *Proceedings* 379-382.

*Научни радови објављени у водећим часописима националног значаја*

**M51**

1. **Rupar JS**, Dobričić VD, Aleksić MM, Brborić JS, Čudina OA. A Review of Published Data on Acridine Derivatives with Different Biological Activities, *Kragujevac J. Sci.* 2018, 40, p. 83-101.

## 5. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат, магистар фармације Јелена Рупар, је резултатима приказаним у оквиру своје докторске дисертације дала значајан допринос у области Фармацеутске – медицинске хемије и у области Електрохемије – испитивања интеракције једињења са ДНК.

Применом модификоване хемијске методе за синтезу аминокиселинских деривата акридина, синтетисана су нова једињења, први пут објављена у оквиру публикација које су део ове дисертације, што представља својеврсни допринос досадашњим научним резултатима. Оптимизовани су услови синтезе, као и услови за пречишћавање једињења.

Испитивањем антитуморске активности (цитотоксичности, утицаја на ћелијски циклус и испитивањем ћелијске смрти) новосинтетисаних једињења, издвојена су четири најактивнија деривата АДА која представљају важне кандидате за даља испитивања и потенцијалну антитуморску активност. Такође, показано је да најактивнија једињења своје дејство могу испољити као инхибитори хумане ДНК топоизомеразе  $\text{II}_\alpha$ , а тестом електрофоретске покретљивости утврђено је да интерагују са ДНК. Испитивање њихове антитуморске активности указало је на велики потенцијал деривата акридина у терапији тумора.

Како метаболички активне ћелије представљају системе у којима се одвијају редокс процеси, примена електрохемијских техника за анализу процеса преноса електрона представља једну од важнијих фаза приликом испитивања нових једињења. У оквиру ове дисертације, испитано је електрохемијско понашање 9-хлороакридина, једињења које је коришћено као прекурсор за синтезу аминокиселинских деривата акридина, али и најактивнијих АДА применом три волтаметријске технике: цикличне, диференцијално пулсне и волтаметрије правоугаоних таласа на електроди од стакластог угљеника. Резултати публиковани у радовима који чине део ове дисертације значајно су допринели разумевању редокс процеса који се одвијају у наведеним молекулима. Применом волтаметрије правоугаоних таласа, тачније електрохемијског ДНК биосензора, чија је припрема оптимизована, испитана је интеракција 9-хлороакридина и најактивнијих АДА са ДНК. Утврђен је тип интеракције испитиваних једињења и одређена је константа везивања за ДНК, као и стехиометријски однос. Подаци проистекли из наведених истраживања допринели су разумевању типа и природе интеракције једињења и ДНК. Резултати представљени у овој дисертацији недвосмислено указују да стехиометријски однос може бити различит, зависно од концентрације супстанце која интерагује са ДНК. До сада није испитивана интеракција једињења са ДНК у тако широком опсегу концентрација као што је приказано у овој дисертацији, такође стехиометријски однос различит од 1:1 приликом интеракције деривата акридина са ДНК није до сада објављен. Овим истраживањима дат је значајан допринос у будућим испитивањима интеракције једињења и ДНК.

## 6. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Београд, . 10.2023.

Ментори

---

Др сц. Оливера Чудина, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

---

Др сц. Мара Алексић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

## 7. ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу изложеног, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата магистра фармације Јелене Рупар, представља оригинално и адекватно написано научно дело. Кандидаткиња је успешно реализовала постављене циљеве истраживања, а резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан научни допринос у области Фармацеутске – медицинске хемије и у области електрохемијског испитивања интеракције једињења са ДНК.

Резултати докторске дисертације су публиковани у два рада у врхунским међународним часописима (M21), једном раду у истакнутом међународном часопису (M22), једном раду у водећем часопису националног значаја (M51) и у оквиру два саопштења на међународним скуповима штампана у целини (M33).

Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује докторску дисертацију магистра фармације Јелене Рупар под називом:

**„Синтеза, електрохемијско испитивање интеракција са ДНК и *in vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина“**

и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета да прихвати овај Извештај о завршеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, 13. 10. 2023.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др сц. Јасмина Брборић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Владимир Добричић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Александра Јаношевић Лежаић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Јелена Граховац, виши научни сарадник  
Институт за онкологију и радиологију Србије