

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nemanja M. Turković

**DIZAJNIRANJE, SINTEZA I *IN VITRO* ISPITIVANJA
DERIVATA PROPIOFENONA KAO POTENCIJALNIH
INHIBITORA ENZIMA HIV-1 PROTEAZE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Nemanja M. Turković

**DESIGN, SYNTHESIS AND *IN VITRO* TESTING OF
PROPIOPHENONE DERIVATIVES AS POTENTIAL
INHIBITORS OF THE ENZYME HIV-1 PROTEASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTORI:

dr sc. Zorica Vujić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Branka Ivković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor
Univerzitet Odbrane-Medicinski fakultet, VMA

Datum odbrane: _____

DIZAJNIRANJE, SINTEZA I *IN VITRO* ISPITIVANJA DERIVATA PROPIOFENONA KAO POTENCIJALNIH INHIBITORA ENZIMA HIV-1 PROTEAZE

REZIME

Detaljno poznavanje strukture HIV-1 proteaze, enzima koji igra ključnu ulogu u životnom ciklusu virusa humane imunodeficijencije (HIV), kao i njegovog supstrata, dovelo je do razvoja specifičnih inhibitora. Razvoj i klinička primjena inhibitora HIV-1 proteaze, gotovo odmah nakon identifikacije ovog enzima, kao ciljnog mjesta dejstva, predstavlja jedan od najuspješnijih primjera racionalnog dizajna lijekova. Ispitivanja su pokazala da anti-HIV-1 proteaznu aktivnost, između ostalih, imaju i propiofenonski derivati (halkoni).

U postupku ispitivanja supstituisanih derivata halkona koji pokazuju anti-HIV-1 proteaznu aktivnost ovo istraživanje se baziralo na *docking* studijama. Primjenom kompjuterskog programa *ChemOffice v7.0 Ultra* optimizovani su komercijalno dostupni inhibitori HIV proteaze, osnovne *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-onske strukture i mono, di i tri supstituisani derivati *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-onske strukture. Ispitivanje potencijalnih interakcija halkona (derivata *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-on) sa aminokiselinama u aktivnom mjestu HIV-1 proteaze kao i uticaja različitih supstituenata na pozicioniranje i formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mjestu je izvedeno *docking* studijama, primjenom programa *AutoDock Vina*. Validacija izvedene *docking* studije je izvršena poređenjem konformacije liganda iz kokristala sa ciljnim mjestom (koja je određena primjenom X-ray difrakcije) sa konformacijom iz *docking* proračuna (predviđena konformacija liganda na vezivnom mjestu enzima) pri čemu je dobijena RMSD od 0,71 Å potvrdila uspješno predviđanje. Za vizuelizaciju interakcija ispitivanih jedinjenja sa ciljnim mjestom korišćen je računarski program *Discovery Studio Visualizer 2017*. Rezultati *docking*-a ukazuju da stabilizaciji kompleksa halkon-enzim u najvećoj mjeri doprinosi *orto*- disupstitucija prstena B fenolnim grupama. Broj vodoničnih veza je veći, što ide u prilog podatku da povećanje broja vodoničnih veza smanjuje mogućnost mutacija. Prsten B je potrebno supstituisati grupama sa jakim -I efektom (fluoro grupe), kao i voluminoznim grupama sa jakim -I efektom (trifluorometil grupa).

Na osnovu sprovedenih *docking* studija izvršen je izbor polaznih *orto*- i *para*-, mono- i di- supstituisanih benzaldehida kao i *orto*- i *para*-, mono- i di- supstituisanih acetofenona u cilju sinteze derivata halkona koji su pokazali najbolju aktivnost. Reakcijom aldolne kondenzacije (*Claisen-Schmidt*-ova reakcija) polaznih jedinjenja dobijeno je 17 novih supstituisanih derivata halkona. Za prečišćavanje dobijenih jedinjenja korišćena je preparativna *dry flash* hromatografija na koloni ili preparativna tankoslojna hromatografija na silikagelu. Jedinjenja su dodatno prečišćena prekrizacijom. Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih jedinjenja je izvršena određivanjem tačke topljenja i primjenom instrumentalnih metoda: IC, NMR i MS-MS spektroskopijom.

Korišćenjem tri RP-TLC sistema (acetonitril-voda, etanol-voda i aceton-voda) izračunati su parametri R_M^0 , S i C_0 na osnovu kojih je procijenjeno retenciono ponašanje sintetisanih jedinjenja. Eksperimentalno dobijene vrijednosti particionih koeficijenata ($\log P$) su korelisane sa kompjuterski izračunatim $\log P$ vrijednostima, dobijenim primjenom programa *ChemDraw 17* i *MarvinSketch*. Najveći stepen podudarnosti postoji između C_0 vrijednosti dobijenih za hromatografski sistem acetonitril-voda i izračunatih $\log P$ vrijednosti (r vrijednost od 0,80 do 0,84) pa se jednačina koja opisuje ovu zavisnost može upotrijebiti za predviđanje retencije novih halkona. Istovremeno i sistem acetonitril-voda je odabran kao najpouzdaniji za detaljnije proučavanje odnosa između strukture i retencije kongenerisanih halkona. Formirana su tri QSRR modela korišćenjem C_0 , koji je određen u RP-TLC sistemu acetonitril-voda, kao zavisna promjenljiva i odabrani molekularni deskriptori, kao nezavisne promjenljive. Dobijeni statistički parametri, $r = 0,83$, $R^2 \text{ pred} = 0,94$, kao i rezultat ukrštene validacije

$Q^2 = 0,68$ ukazuju na visoku prognostičku sposobnost SVM (C_0) modela. Deskriptori koji formiraju SVM (C_0) model su: bcutp8, ATSp4 i kappam2.

In vitro ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih halkona vršeno je fluorimetrijskom metodom, primjenom komercijalno dostupnog kita SensoLyte® 490 HIV-1 Protease Assay Kit (fluorimetric) (AnaSpec, Fremont, SAD). Metoda se zasniva na primjeni sintetskog peptida koji je supstrat za HIV-1 proteazu i koga čini fluorescentni molekul (EDANS) za koji je vezan molekul koji smanjuje fluorescenciju (DABCIL). Testovi su izvedeni na mikroploči sa 384 bazenčića (Microfluor® 1, Thermo Scientific, Voltam, SAD), u triplikatima. Ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti je obuhvatilo sve sintetisane supstituisane derivate halkona i tri komercijalna HIV proteazna inhibitora (lopinavir, ritonavir i darunavir) (raspon koncentracija od 0,001 do 100 μM). Jedinjenje C1-42-Ch14 pokazuje jaču inhibitornu aktivnost (0,0012 μM) u odnosu na referentne lijekove lopinavir i ritonavir, i sličnu aktivnost sa darunavirom. Među ispitivanim jedinjenjima, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21, C10-26-Ch22, C13-52-Ch6 i C14-18-Ch24 su pokazali inhibitornu aktivnost uporedivu sa komercijalnim proizvodima sa IC_{50} vrijednostima: 0,014; 0,0104; 0,0104; 0,012 i 0,0104 μM .

Za razvoj i validaciju QSAR modela korišćen je kompjuterski program *MarvinSketch 19.3*. Za kreiranje i analizu QSAR modela korišćen je program *Pentacle 1.07*, koji koristi GRIND deskriptore (*GRIND-Independent Descriptors*), izvedene iz interakcionih polja molekula (*Molecular Interaction Fields - MIFs*). Primjenom PLS (*Partial Least Square*) regresije između izračunatih GRIND deskriptora i eksperimentalno određenih IC_{50} vrijednosti ispitivanih jedinjenja formiran je 3D-QSAR model, kao smjernica za dizajniranja novih inhibitora HIV-1 proteaze halkonske strukture. Na osnovu predviđenih ADMET osobina dizajnirana jedinjenja: D6, D9, E1, E2, E3, E4, F1 i F4 su izdvojena kao potencijalni kandidati za buduću sintezu i biološka ispitivanja.

Ispitivanje i poređenje redoks potencijala novosintetisanih halkona je izvedeno korišćenjem biološkog materijala - serumskog pula zdravih ispitanika u nativnim uslovima. Prooksidativni i antioksidativni skorovi su računati primjenom z-skor statistike prema obrascu: $(X-\mu)/\sigma$, gdje su X - vrijednost određenog parametra redoks statusa; μ - populaciona srednja vrijednost i σ - populaciona standardna devijacija tog parametra određene u serumima zdravih osoba. Oksidativni skor je određen u uzorcima seruma u kojima je, osim halkona, dodat i terc-butil hidroperoksid (TBH), snažan sintetski prooksidans, kao i u čistom serumu. Pri ispitivanju i poređenju antioksidativne sposobnosti novosintetisanih jedinjenja, kao kriterijum za procjenu postojanja statistički značajne razlike, odnosno korelacije prihvaćena je p vrijednost iz Mann-Whitney U testa poslije Kruskal-Wallisovog testa ($p < 0,001$). Jedinjenja sa najnižom vrijednošću oksidativnog skora su: C4-27-Ch17, C1-42-Ch14, C5-32-Ch18, C10-26-Ch22, C14-18-Ch24, Ch12, 66-Ch11 i Ch13. Najveća vrijednost oksidativnog skora (najveća prooksidativna aktivnost) je dobijena za halkan C12-17-Ch23. Upravo *ortho* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama doprinosi kako anti-HIV proteaznoj, tako i antioksidativnoj aktivnosti halkona.

Ključne riječi: HIV proteaza, propiofenoni, halkoni, *docking*, lipofilnost, antioksidativna aktivnost, 3D-QSAR

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija

DESIGN, SYNTHESIS AND *IN VITRO* TESTING OF PROPIOPHENONE DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF THE ENZYME HIV-1 PROTEASE

ABSTRACT

Detailed knowledge of the structure of HIV-1 protease, an enzyme which plays a key role in the life cycle of the virus, as well as its substrate, has led to the development of specific inhibitors. The development and clinical application of HIV-1 protease inhibitors, almost immediately after the identification of the enzyme, as a drug target, is one of the most successful examples of rational drug design. Studies have shown that, among others, propiophenone derivatives (chalcones) have anti-HIV-1 protease activity.

Study of substituted chalcone derivatives showing anti-HIV-1 protease activity was based on docking. Using the computer program *ChemOffice v7.0 Ultra*, commercially available HIV protease inhibitors, basic *trans*-1,3-diaryl-2-propen-1-one structures and mono, di and three substituted *trans*-1,3-diaryl-2-propen-1-one derivatives were optimized. Investigation of potential interactions of chalcone (*trans*-1,3-diaryl-2-propen-1-one derivatives) with amino acids in the active site of HIV-1 protease as well as the influence of different substituents on the positioning and formation of additional interactions in the active site was performed by docking using the *AutoDock Vina* program. Validation of the performed docking study was carried out by comparing the conformation of the ligand from the co-crystal with the target site (determined by X-ray diffraction) with the conformation from the docking calculation (docked pose) where the obtained RMSD of 0.71 Å confirmed the successful prediction. The computer program *Discovery Studio Visualizer 2017* was used to visualize the interactions of the tested compounds with the target site. The docking results indicate that the *ortho*- disubstitution of ring B by phenolic groups contributes the most to the stabilization of the chalcone enzyme complex. The number of hydrogen bonds is higher, which supports the fact that increasing the number of hydrogen bonds reduces the possibility of mutations. Ring B should be substituted with groups with strong -I effect (fluoro groups) as well as voluminous groups with strong -I effect (trifluoromethyl group).

Based on the conducted docking studies, the initial *ortho*- and *para*-, mono- and di-substituted benzaldehydes as well as *ortho*- and *para*-, mono- and di-substituted acetophenones were selected in order to synthesize the chalcone derivatives that showed the best activity. The aldol condensation reaction (Claisen-Schmidt reaction) of the starting compounds gave 17 new substituted chalcone derivatives. For the purification of the obtained compounds, preparative column flash chromatography or preparative thin layer chromatography on silica gel was used. The compounds were further purified by recrystallization. Physico-chemical characterization of the synthesized compounds was performed by determining the melting point and applying instrumental methods: IC, NMR and MS-MS spectroscopy. Using three RP-TLC systems (acetonitrile-water, ethanol-water and acetone-water), the parameters R_M^0 , S and C_0 , were calculated on the basis of which the retention behavior of the synthesized compounds was estimated. The experimentally obtained values of partition coefficients ($\text{Log}P$) were correlated with computer-calculated $\text{Log}P$ values, obtained using *ChemDraw 17* and *MarvinSketch*. The highest degree of agreement exists between the C_0 values obtained for the acetonitrile-water chromatographic system and the calculated $\text{Log}P$ values (r value from 0.80 to 0.84), so the equation describing this dependence can be used to predict the retention of new chalcones. At the same time, the acetonitrile-water system was selected as the most reliable for a more detailed study of the relationship between the structure and retention of chalcones. Three QSRR models were formed using C_0 , which was determined in the RP-TLC system acetonitrile-water, as a dependent variable, and selected molecular descriptors, as independent variables. The obtained statistical parameters, $r = 0.83$, $R^2_{\text{pred}} = 0.94$ as well as the result of cross-validation $Q^2 = 0.68$ indicate a high prognostic ability of the SVM (C_0) model. The descriptors that form the SVM (C_0) model are: *bcutp8*, *ATSp4* and *kappam2*.

In vitro testing of the anti-HIV-1 protease activity of the synthesized chalcones was performed by the fluorimetric method, using the commercially available SensoLyte® 490 HIV-1 Protease Assay Kit (fluorimetric) (AnaSpec, Fremont, USA). The method is based on the use of a synthetic peptide which is a substrate for HIV-1 protease and which consists of a fluorescent molecule (EDANS) to which a fluorescence reducing molecule (DABCIL) is attached. The tests were performed on a 384 well microplate (Microfluor® 1, Thermo Scientific, Voltam, USA), in triplicates. Anti-HIV-1 protease activity assays included all synthesized substituted chalcone derivatives and three commercial HIV protease inhibitors (lopinavir, ritonavir, and darunavir) (concentration range 0.001 to 100 µM). Compound C1-42-Ch14 showed stronger inhibitory activity (0.0012 µM) compared to the reference drugs lopinavir and ritonavir, and similar activity to darunavir. Among the test compounds, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21, C10-26-Ch22, C13-52-Ch6 and C14-18-Ch24 showed inhibitory activity comparable to commercial products with IC₅₀ values of: 0.014; 0.0104; 0.0104; 0.012 and 0.0104 µM.

The computer program *MarvinSketch 19.3* was used for the development and validation of the QSAR model. *Pentacle 1.07* which uses GRIND descriptors (GRid-INdependent Descriptors), derived from the interaction fields of molecules (Molecular Interaction Fields - MIFs), was used to create and analyze the QSAR model. Using PLS (Partial Least Square) regression between the calculated GRIND descriptors and experimentally determined IC₅₀ values of the tested compounds, a 3D-QSAR model was formed, as a guideline for designing new HIV-1 protease inhibitors of chalcone structure. Based on the predicted ADMET properties, the designed compounds: D6, D9, E1, E2, E3, E4, F1 and F4 were singled out as potential candidates for future synthesis and biological testing.

Examination and comparison of redox potential of newly synthesized chalcones was performed using biological material - serum pool of healthy subjects under native conditions. Prooxidative and antioxidant scores were calculated using z-score statistics according to the pattern: $(X - \mu) / \sigma$, where the X - values of a particular parameter are redox status; μ - population mean and σ - population standard deviation of this parameter determined in the sera of healthy individuals. The oxidative score was determined in serum samples in which, in addition to chalcone, tert-butyl hydroperoxide (TBH), a strong synthetic prooxidant, was added, as well as in pure serum. When examining and comparing the antioxidant capacity of newly synthesized compounds, the p value from the Mann-Whitney U test after the Kruskal-Wallis test (p < 0.001) was accepted as a criterion for assessing the existence of a statistically significant difference or correlation. The compounds with the lowest oxy-score value are: C4-27-Ch17, C1-42-Ch14, C5-32-Ch18, C10-26-Ch-22, C14-18-Ch24, Ch12, 66-Ch11 and Ch13. The highest value of oxy score (the highest prooxidative activity) was obtained for chalcone C12-17-Ch23. The *ortho*-disubstitution of ring B of the 1,3-diphenyl-2-propen-1-one structure by phenolic groups contributes to the anti-HIV protease and antioxidant activity of chalcones.

Key words: HIV protease, propiophenones, chalcones, docking, lipophilicity, antioxidant activity, 3D-QSAR

Scientific field: Pharmaceuticals

Scientific subfield: Pharmaceutical and medicinal chemistry

LISTA SKRAĆENICA

ABTS	2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)
AD	domen primjenljivosti (engl. <i>applicability domain</i>)
ADMET	apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost
ADT	AutoDockTools 1.5.6
AIDS	engl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Ala	Alanin
ANN	vještačka neuronska mreža (engl. <i>artificial neural network</i>)
ART	antiretrovirusna terapija (engl. <i>antiretroviral therapy</i>)
Asp	asparaginska kiselina
CA	virusni kapsid (engl. <i>capsid</i>)
CD4	klaster diferencijacije 4 (engl. <i>cluster of differentiation 4</i>)
CTL	citotoksični T limfocit (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DABCYL	4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzojeva kiselina
DFT	teorija funkcionalne gustine (engl. <i>density functional theory</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina
DTT	Ditiotreitol
EA	evolucioni algoritam
EDANS	5-((2-aminoetil)amino)naftalen-1-sulfonska kiselina
EIAV	virus infektivne anemije konja (engl. <i>equine infectious anemia virus</i>)
FDA	Uprava za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FDC	folikularna dendritska ćelija (engl. <i>follicular dendritic cells</i>)
FF	<i>force field</i> funkcija bodovanja
FRET	prenos rezonantne energije fluorescencije (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GA	genetski algoritam (engl. <i>genetic algorithms</i>)
Gly	Glicin
GRIND	<i>GRid-INdependent</i> Deskriptor

HAART	visoko aktivna antiretrovirusna terapija (engl. <i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HBA	akceptor vodonične veze (engl. <i>hydrogen bond acceptor</i>)
HCV	hepatitis C virus
HIV	engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
HKU	hidrogen-peroksid komplementarne jedinice
HLA	humani leukocitni antigen (engl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HTLV	virus leukemije T-limfocita (engl. <i>human T-cell leukemia virus</i>)
IC₅₀	koncentracija jedinjenja koja je potrebna da dovede do 50% inhibicije (engl. <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
Ile	Izoleucin
IR	infracrvena spektroskopija
LAV	virus udružen s limfadenopatijom (fr. <i>lymphadénopathie associé virus</i>)
Leu	Leucin
MA	virusni matriks (engl. <i>matrix</i>)
MC	<i>Monte Carlo</i> metoda
MIFs	interakciona polja molekula (engl. <i>molecular interaction fields</i>)
MLR	multipla linearna regresiona analiza (engl. <i>multiple linear regression</i>)
MS	masena spektroskopija
NC	virusni nukleokapsid (engl. <i>nucleocapsid</i>)
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
PAB	prooksidativno-antioksidativni balans
Phe	Fenilalanin
PLS	parcijalna regresiona analiza najmanjih kvadrata (engl. <i>partial least squares regression</i>)
Pro	Prolin
PUFA	polinezasićena masna kiselina (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
QSAR	kvantitativni odnos strukture i dejstva (engl. <i>quantitative structure–activity relationship</i>)
QSPR	kvantitativni odnos strukture i osobina (engl. <i>quantitative structure–property relationship</i>)

QSRR	kvantitativna veza između strukture i retencije (engl. <i>quantitative structure-property relationship</i>)
QSTR	kvantitativni odnos strukture i toksičnosti (engl. <i>quantitative structure – toxicity relationship</i>)
RBS	reaktivna bromova jedinjenja (engl. <i>reactive bromine species</i>)
RCS	reaktivna hlorova jedinjenja (engl. <i>reactive chlorine species</i>)
RFU	relativna fluorescentna jedinica (engl. <i>relative fluorescence unit</i>)
RMSD	devijacija kvadratnog korijena srednje vrijednosti
RMSE	korijen srednje kvadratne greška (engl. <i>root mean square error</i>)
RMSEE	korijen srednje kvadratne greška eksperimentalne vrijednosti (engl. <i>root mean square error of estimation</i>)
RMSEP	korijen srednje kvadratne greška predviđene vrijednosti (engl. <i>root mean square error of prediction</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivna azotna jedinjenja (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivna kiseonikova jedinjenja (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RP-HPLC	reverzno-fazna visoko-efikasna tečna hromatografija (engl. <i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>)
RP-TLC	reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (engl. <i>reversed phase thin layer chromatography</i>)
RT	reverzna transkriptaza
SAR	odnos strukture i dejstva (engl. <i>structure activity relationships</i>)
Ser	Serin
SHG	sadržaj sulfhidrilnih grupa
SIV	virus majmunske imunotropije (engl. <i>simian immunotropic virus</i>)
SO	engl. <i>swarm optimization</i>
SVM	algoritam potpornih vektora (engl. <i>support vector machine</i>)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TAS	totalni antioksidativni status
TBH	Tercbutilhidroperoksid
Thr	Treonin
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TMS	Tetrametilsilan
TMV	engl. <i>tobacco mosaic virus</i>
TOS	totalni oksidativni status
Val	Valin
VDW	<i>van der Waals</i> -ove interakcije

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opšti dio	2
1.2. HIV	4
1.2.1. Struktura HIV-a.....	5
1.2.2. Replikacija HIV-a	6
1.2.3. Patogeneza i tok HIV infekcije	9
1.2.4. Epidemiologija	11
1.2.5. Anti-HIV lijekovi	12
1.2.5.1. Inhibitori reverzne transkriptaze.....	13
1.2.5.1.1. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze	13
1.2.5.1.2. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze.....	13
1.2.5.2. Inhibitori HIV proteaze.....	14
1.2.5.2.1. Struktura i funkcija HIV proteaze.....	14
1.2.5.2.2. Inhibitori HIV proteaze.....	18
1.2.5.2.3. Rezistencija na inhibitore HIV-1 proteaze.....	22
1.3. Molekulski <i>docking</i>	23
1.3.1. Komponente <i>docking</i> programa	24
1.3.1.1. <i>Shape matching</i>	24
1.3.1.2. Sistematsko pretraživanje	24
1.3.1.3. Stohastički algoritmi	25
1.3.2. Fleksibilnost proteina.....	26
1.3.2.1. <i>Soft docking</i>	26
1.3.2.2. Fleksibilnost bočnih lanaca.....	26
1.3.2.3. Molekulska relaksacija	26
1.3.2.4. <i>Ensemble docking</i> (<i>Docking</i> multiplih proteinskih struktura)	26
1.3.3. Funkcije bodovanja	27
1.3.3.1. <i>Force field</i> funkcije bodovanja.....	27
1.3.3.2. Funkcije empirijskog bodovanja.....	27
1.3.3.3. <i>Knowledge-based</i> funkcije bodovanja.....	28
1.3.4. <i>AutoDock Vina</i>	28
1.4. Halkoni	30

1.4.1.	Anti-HIV-1 proteazna aktivnost halkona.....	30
1.5.	Lipofilnost.....	31
1.5.1.	Parametri lipofilnosti.....	31
1.5.2.	Određivanje parametara lipofilnosti.....	32
1.5.2.1.	<i>Shake flask</i> metoda.....	32
1.5.2.2.	Hromatografske metode.....	33
1.5.2.2.1.	Reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (RP-TLC).....	33
1.5.2.2.2.	Reverzno-fazna visoko-efikasna tečna hromatografija (RP-HPLC).....	34
1.5.2.3.	Kapilarna elektroforeza.....	35
1.5.2.4.	pH-metrijska metoda.....	35
1.5.2.5.	Metoda filter probe.....	35
1.5.3.	Računarske metode za predviđanje parametara lipofilnosti.....	36
1.5.4.	Kvantitativna veza između strukture i retencije (engl. <i>quantitative structure-retention relationship</i> - QSRR).....	36
1.6.	Redoks aktivnost.....	38
1.6.1.	Oksidativni stres.....	38
1.6.2.	Slobodni radikali.....	38
1.6.3.	Antioksidansi.....	40
1.6.4.	Oksidativni stres i AIDS – antioksidativno dejstvo halkona.....	41
1.7.	Kvantitativni odnos strukture i dejstva (engl. <i>quantitative structure–activity relationship</i> - QSAR).....	43
1.7.1.	Odnos strukture i dejstva (engl. <i>structure activity relationships</i> - SAR).....	43
1.7.2.	Kvantitativni odnos strukture i dejstva (QSAR).....	44
1.7.3.	Molekulski deskriptori.....	46
1.7.4.	3D-QSAR.....	47
1.7.5.	<i>GRid-INdependent</i> Deskriptori (GRIND).....	47
2.	CILJ RADA.....	49
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	52
3.1.	Molekulski <i>docking</i> derivata propiofenona.....	53
3.1.1.	Računarski programi.....	53
3.1.2.	Molekulsko modelovanje i <i>docking</i> simulacija.....	53
3.2.	Sinteza derivata propiofenona i njihova strukturna analiza.....	54
3.2.1.	Reagensi.....	54
3.2.2.	Oprema i aparati.....	55

3.2.3.	Priprema rastvora koji su korišćeni u sintezi	55
3.2.4.	Opšti postupak sinteze <i>orto-</i> , <i>para-</i> ili <i>meta-</i> , mono ili disupstituisanih derivata propiofenona (halkona)	56
3.2.5.	Strukturna analiza	56
3.3.	Određivanje lipofilnosti derivata propiofenona primjenom RP-TLC i kompjuterskih metoda	58
3.3.1.	Reagensi	58
3.3.2.	Oprema i aparati	58
3.3.3.	Računarski programi	58
3.3.4.	Priprema rastvora za hromatografsku analizu	58
3.3.5.	Hromatografska analiza	58
3.3.6.	Izračunavanje vrijednosti $\text{Log}P$ primjenom kompjuterskih programa	60
3.3.7.	Geometrijska optimizacija i izračunavanje molekulskih deskriptora	60
3.3.8.	QSRR analiza	60
3.4.	<i>In vitro</i> ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti derivata propiofenona	61
3.4.1.	Reagensi i ispitivana jedinjenja	61
3.4.2.	Oprema i aparati	62
3.4.3.	Priprema radnih rastvora	62
3.4.4.	Izvođenje enzimske reakcije	64
3.5.	QSAR analiza anti-HIV1-proteazne aktivnosti	69
3.5.1.	Računarski programi	69
3.5.2.	Formiranje 3-D QSAR modela	69
3.5.3.	Validacija modela	70
3.5.4.	<i>In silico</i> ispitivanje ADMET osobina	70
3.6.	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti derivata propiofenona	71
3.6.1.	Oprema i aparati	71
3.6.2.	Reagensi	71
3.6.3.	Biološki materijal	71
3.6.4.	Priprema rastvora i reagenasa	72
3.6.5.	Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)	75
3.6.6.	Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS)	76
3.6.7.	Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)	77
3.6.8.	Određivanje sadržaja sulfhidrilnih grupa (SHG)	77
3.6.9.	Izračunavanje prooksidativnog, antioksidativnog i oksidativnog skora	78

3.6.10. Statistička analiza	79
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	80
4.1. Rezultati i diskusija <i>docking</i> -a	81
4.1.1. <i>Docking</i> simulacija interakcija registrovanih inhibitora i osnovnih propiofenonskih struktura.....	81
4.1.2. <i>Docking</i> simulacija interakcija propiofenonskih derivata (halkona)	84
4.2. Rezultati i diskusija sinteze	95
4.2.1. Sinteza halkona	95
4.2.2. Strukturna analiza sintetisanih jedinjenja	96
4.3. Rezultati i diskusija određivanja lipofilnosti derivata propiofenona primjenom RP-TLC i kompjuterskih metoda	104
4.3.1. Određivanje parametara lipofilnosti primjenom RP-TLC metode	105
4.3.2. Određivanje parametara lipofilnosti primjenom kompjuterskih programa.....	108
4.3.3. QSRR analiza.....	109
4.4. Rezultati i diskusija <i>in vitro</i> ispitivanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti derivata propiofenona.....	113
4.5. Rezultati i diskusija QSAR studije.....	124
4.6. Rezultati i diskusija ispitivanja redoks aktivnosti derivata propiofenona.....	138
5. ZAKLJUČAK	158
6. LITERATURA.....	161
7. PRILOZI	172
8. BIOGRAFIJA AUTORA I SPISAK PUBLIKOVANIH RADOVA I SAOPŠTENJA	182
9. IZJAVE.....	185

1. UVOD

1.1. Opšti dio

Virus humane imunodefijencije (engl. *human immunodeficiency virus* - HIV) je retrovirus koji uzrokuje bolest nazvanu sindrom stečene imunodefijencije (engl. *acquired immune deficiency syndrome* - AIDS).

Od početka osamdesetih godina dvadesetog vijeka, kada je AIDS identifikovan, pa sve do 2018. godine, ova bolest je prouzrokovala oko 32 miliona smrtnih slučajeva širom svijeta.

Široka primjena antiretrovirusne terapije (engl. *antiretroviral therapy* - ART) na globalnom nivou je glavni razlog pada broja smrtnih slučajeva vezanih za HIV za čak 56 % u odnosu na 2004. godinu kada je registrovano 1,7 miliona smrtnih slučajeva. Predviđanja Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) su da će do 2030. godine biti manje od 200 000 novoinficiranih virusom HIV-a [1]. Trenutno se u terapiji koristi šest glavnih grupa antiretrovirusnih lijekova: inhibitori reverzne transkriptaze - nukleozidni i nenukleozidni inhibitori; inhibitori proteaze; inhibitori integraze; inhibitor fuzije (enfuvirtid) i antagonist hemokinih receptora 5 (maravirok). Sedma grupa lijekova, inhibitori sazrijevanja, još uvijek nije odobrena jer je njihova efikasnost umanjena polimorfizmima HIV-1 koji se prirodno javljaju u 30-40 % izolata HIV-1 [2]. Od otkrića HIV-a, američka Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration* - FDA) odobrila je 26 anti-HIV jedinjenja od kojih su deset inhibitori HIV proteaze.

Kao jedno od ciljnih mjesta za razvoj anti-HIV lijekova prepoznat je enzim HIV proteaza, koji igra ključnu ulogu u životnom ciklusu virusa. Detaljno poznavanje strukture HIV proteaze i njenog supstrata dovelo je do razvoja specifičnih inhibitora. Inhibitori HIV proteaze su dizajnirani tako da se sa visokim afinitetom vezuju za virusnu proteazu, ali imaju tendenciju da zauzimaju više prostora u aktivnom mjestu od prirodnih supstrata. U kliničkoj upotrebi se nalazi više inhibitora proteaze: sakvinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir i darunavir. Većina ovih lijekova se primjenjuje zajedno sa malim dozama ritonavira kao farmakokinetičkog „pojačivača“, što dovodi do smanjenja razvoja rezistencije. Svi navedeni inhibitori su konkurentni peptidomimetici sa hidrosietilenaminskim jezgrom [2, 3].

Svi inhibitori proteaze u sadašnjoj kliničkoj praksi odobreni su samo za oralnu primjenu. Apsorpcija u gastrointestinalnom traktu i difuzija kroz biološke membrane je obično slaba do umjerena. Ovaj efekat nastaje dijelom zbog vezivanja za P-glikoprotein sa posljedičnim efluksom lijeka, a dijelom zbog velikog vezivanja za proteine u plazmi (90-99%). Navedeni faktori dovode do niže koncentracije lijekova na ciljnom mjestu dejstva i mogu dovesti do kontinuirane replikacije virusa i pojave rezistencije [4].

Trenutno najefikasnija terapija AIDS-a je kombinovana terapija primjenom inhibitora HIV proteaze, inhibitora reverzne transkriptaze i/ili inhibitora integraze. Primjenom ove visoko aktivne antiretrovirusne terapije (engl. *highly active antiretroviral therapy* - HAART), smrtnost od AIDS-a naglo je opala, a AIDS postepeno postaje hronična bolest koja se može kontrolisati.

I pored postojanja efikasne terapije, postoji stalna potreba za razvojem bezbjednijih i jeftinijih lijekova, efikasnih protiv multirezistentnih sojeva virusa, sa visokom antivirusnom aktivnošću, boljim farmakokinetičkim osobinama, uz postizanje bolje komplijanse kroz rjeđe doziranje i manje ispoljavanje neželjenih dejstava. Imajući u vidu da su inhibitori HIV

proteaze lipofilna jedinjenja koja imaju malu bioraspoloživost i kratko biološko poluvrijeme eliminacije, osnovni ciljevi u razvoju novih inhibitora HIV proteaze su: povećanje hidrofilitnosti; povećanje bioraspoloživosti; povećanje metaboličke stabilnosti i borba protiv multirezistentnih sojeva HIV proteaze, odnosno sinteza malih molekula, nepeptidne strukture [5].

Propiofenonski derivati, kojima pripadaju i prirodni proizvodi - halkoni (nastaju u biljkama kao intermedijeri u sintezi flavonoida), bi upravo mogli ispuniti navedene zahtjeve novih anti-HIV lijekova.

Halkoni su prirodni proizvodi, ali se danas sve više dobijaju polu- ili totalnom sintezom, reakcijom aldolne kondenzacije (*Claisen-Schmidt*-ova reakcija) [6].

Halkoni pokazuju različitu biološku aktivnost: antiinflamatornu [7], antioksidativnu [8], antibakterijsku [9], fungicidnu [10], antiproliferativnu [11], tuberkulostatsku [12]. Noviji literaturni podaci ukazuju da halkoni pokazuju i antivirusnu aktivnost prema različitim virusima [6, 13] uključujući i anti-HIV dejstvo [7]. Cole i saradnici [14] su pokazali da O-benzil supstituisani derivati halkona pokazuju > 92 % inhibicije virusa bez uticaja na ćelije domaćina. Halkoni, takođe spadaju u neenzimske antioksidanse, a jačina njihovog antioksidativnog efekta direktno zavisi od same strukture [8]. Antioksidativno dejstvo halkona je od velikog značaja jer je oksidativni stres involviran u patogenezu AIDS-a, s obzirom da se virus replicira u visoko oksidovanom okruženju. Osim toga, pored brojnih neželjenih dejstava koje sa sobom nosi, ART povećava oksidativni stres te otuda i potreba za razvojem antioksidativne adjuvantne terapije za pacijente sa HIV-om [15].

Mali je broj literaturnih podataka koji govore o potencijalnoj anti-HIV proteaznoj aktivnosti halkona. Novija istraživanja koja se baziraju na *in silico* metodama pokazuju da za interakcije u aktivnom mjestu nije neophodan etilenaminski most, niti peptidna struktura molekula. Pored polarnih interakcija, ključno mjesto zauzimaju i hidrofobne π - π i π -halogen interakcije. Može se pretpostaviti da bi modifikacije u osnovnoj strukturi halkona mogle uticati na njihovu inhibitornu aktivnost prema enzimu, ali i drugim proteinskim strukturama koje nastaju u životnom ciklusu virusa.

1.2. HIV

HIV pripada rodu *Lentivirus*, familiji *Retroviridae*. Infekcije lentivirusima tipično pokazuju hroničan tok bolesti, sa dugim vremenskim trajanjem kliničke latencije, upornom virusnom replikacijom i posljedicama na centralni nervni sistem. Za sve lentiviruse karakterističan je dug period inkubacije pa su stoga poznati i kao spori virusi [16, 17].

Porijeklo vodi od virusa majmunske imunotropije (engl. *Simian Immunotropic Virus* - SIV), koji inficira afričke pepeljaste mangabi majmune (engl. *sooty mangabey monkeys* – SIV_{smm}). Šimpanze mogu biti inficirane SIV_{smm} i SIV_{cpz} (engl. *chimpanzee*), koji je genetski veoma sličan HIV-u, kao i HIV-om. Međutim, kod primata inficiranih SIV-om i HIV-om ne dolazi do pojave terminalnog stadijuma bolesti, tj. AIDS-a. Takva neprogresivna infekcija predstavlja evoluciono prilagođavanje koje je trajalo više od 10 000 godina i koje omogućava mirnu koegzistenciju lentivirusa primata i imunog sistema domaćina. Filogenetski podaci su pokazali kako je prenosom virusa među vrstama, SIV-a od dva prirodna domaćina, šimpanzi (SIV_{cpz}) i pepeljastog mangabija (SIV_{smm}) na ljude došlo do pojave HIV-a. Smatra se da je za evolucijski preskok sa vrste na vrstu trebalo više od sto godina.

Utvrđeno je postojanje dva tipa HIV-a: HIV-tip 1 (HIV-1) i HIV-tip 2 (HIV-2). Na osnovu redosljeda aminokiselina, homologija između HIV-1 i HIV-2 iznosi 40-60% (u zavisnosti od podtipa). Posmatrano na globalnom nivou, glavni uzročnik AIDS je HIV-1, a HIV-2 je ograničen na neke regije zapadne i centralne Afrike [2].

AIDS je prvi put opisan 1981. godine kod homoseksualaca sa hroničnom multiplom limfadenopatijom i neuobičajenim oportunističkim infekcijama (pneumonija uzrokovana *Pneumocystis carinii*) kao i malignim bolestima (Kapošijev sarkom) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD). Istraživači iz Pasterovog Instituta u Parizu su 1983. godine iz bioptata limfnog čvora bolesnika izolovali virus koji je nazvan virus udružen s limfadenopatijom (fr. *Lymphadénopathie associé virus* - LAV), a 1984. identičan virus je dokazan i u SAD i nazvan je ljudski virus leukemije T-limfocita (engl. *Human T-cell leukemia virus* - HTLV). Od 1986. godine koristi se isključivo naziv virus humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus* - HIV). Na osnovu istraživanja virusnog genoma i epidemioloških i kliničkih podataka o bolesnicima, HIV je prepoznat kao etiološki uzročnik AIDS-a [18].

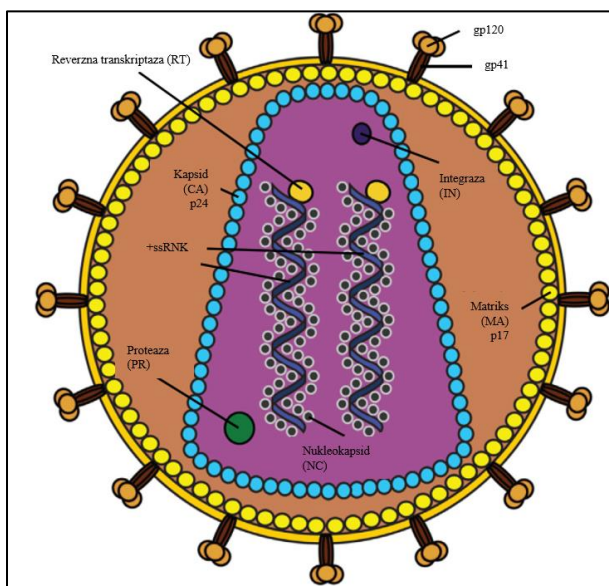
HIV-1 se filogenetski dijeli u četiri grupe označene kao: M, N, O i P koje predstavljaju odvojene i nezavisne prenose SIV na ljude. Grupa M, od engl. *major*, je otkrivena prva i predstavlja pandemijsku formu HIV-1. Odgovorna je za većinu infekcija prouzrokovanih HIV-1 u svijetu (90-95%) i dijeli se na devet podtipova (A-D, F-H, J i K), a ti podtipovi se dalje mogu dijeliti na pod-podtipove (A1-A4 i F1-F2). Grupe N, O i P ograničene su na zapadnu Afriku. Istraživanja su pokazala kako je podtip C odgovoran za gotovo 50% infekcija širom svijeta, podtipovi: A, B, D i G za 12%, 11%, 2%, odnosno 5% infekcija, dok su podtipovi: F, H, J i K zajedno odgovorni za svega 1% infekcija. Podtip A preovladava u centralnoj i istočnoj Africi. Podtip B je dominantan podtip virusa HIV-1 u razvijenijim dijelovima svijeta (zapadna Evropa, Australija, Sjeverna i Južna Amerika) s relativno niskom prevalencom infekcije, dok podtip C preovladava u sup-saharskoj Africi [16].

1.2.1. Struktura HIV-a

HIV čestice imaju prečnik od 100 nm i okružene su membranom bogatom lipoproteinima. Svaka virusna membrana se sastoji od glikoproteinskih heterodimernih kompleksa sastavljenih od spoljašnjih glikoproteina gp120 i transmembranskih glikoproteina gp41. Veza između gp120 i gp41 nije kovalentna i stoga se gp120 može spontano osloboditi, naći u lokalnom okruženju i detektovati u serumu, kao i u okviru limfnog tkiva HIV-inficiranih pacijenata. Tokom procesa izlaska iz inficirane ćelije, virus može u svoju membranu inkorporirati i različite proteine iz ćelijske membrane domaćina, kao što su proteini HLA klasa I i II ili adhezijski proteini (kao što je ICAM-1) koji mogu olakšati adheziju na druge ciljane ćelije. Protein matriksa (p17) je usidren u unutrašnjosti virusne lipoproteinske membrane i naslanja se na virusni kapsid. Virusni kapsid je konusnog oblika i sastavljen je od glavnog strukturnog proteina p24. Kapsid sadrži dvije identične kopije jednonlačane (+)ssRNK, nukleoprotein p9 i enzime: reverznu transkriptazu (RT), integrazu (p32) i proteazu (p10) [3, 4].

HIV karakteriše prisustvo pomoćnih / regulatornih gena koji igraju ključne uloge u modulaciji replikacije virusa. Među njima, *tat* gen kodira protein (Tat) koji se vrlo rano sintetiše nakon infekcije i promovise ekspresiju gena HIV. Rev protein, kojeg kodira *rev* gen, osigurava izlaz iz jedra u citoplazmu ispravno obrađene informacione i genomske RNK. Funkcija ostalih HIV proteina je manje poznata; Vpu je protein neophodan za ispravno oslobađanje čestica virusa, dok *vif* gen kodira mali protein (Vif) koji poboljšava infektivnost čestica virusa. Na kraju, Nef protein ima više funkcija uključujući transdukciju ćelijskog signala i regulaciju CD4 na površini ćelija, kako bi se omogućilo otpuštanje virusa u kasnim fazama ciklusa replikacije virusa [19].

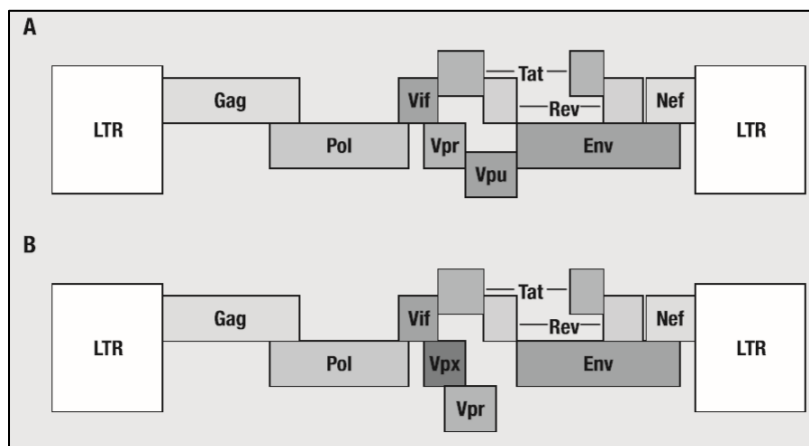
Struktura HIV-a je slična i za HIV-1 i HIV-2 i prikazana je na slici 1.



Slika 1. Struktura HIV

(Preuzeto i prilagođeno iz: Louten J. Human Immunodeficiency Virus. In: Essential Human Virology. Academic Press; 2016. p. 193–211)

Genom HIV je veličine 9.8 kb. Sastoji se od dvije identične kopije RNK molekula i karakteriše se prisustvom strukturnih gena *gag*, *pol*, *env*. HIV-1 i HIV-2 virusi se razlikuju u organizaciji genoma, iako je osnovna struktura (tj. prisustvo tri strukturna gena, *gag*, *pol* i *env*) ista kao i kod svih retrovirusa (Slika 2) [17].



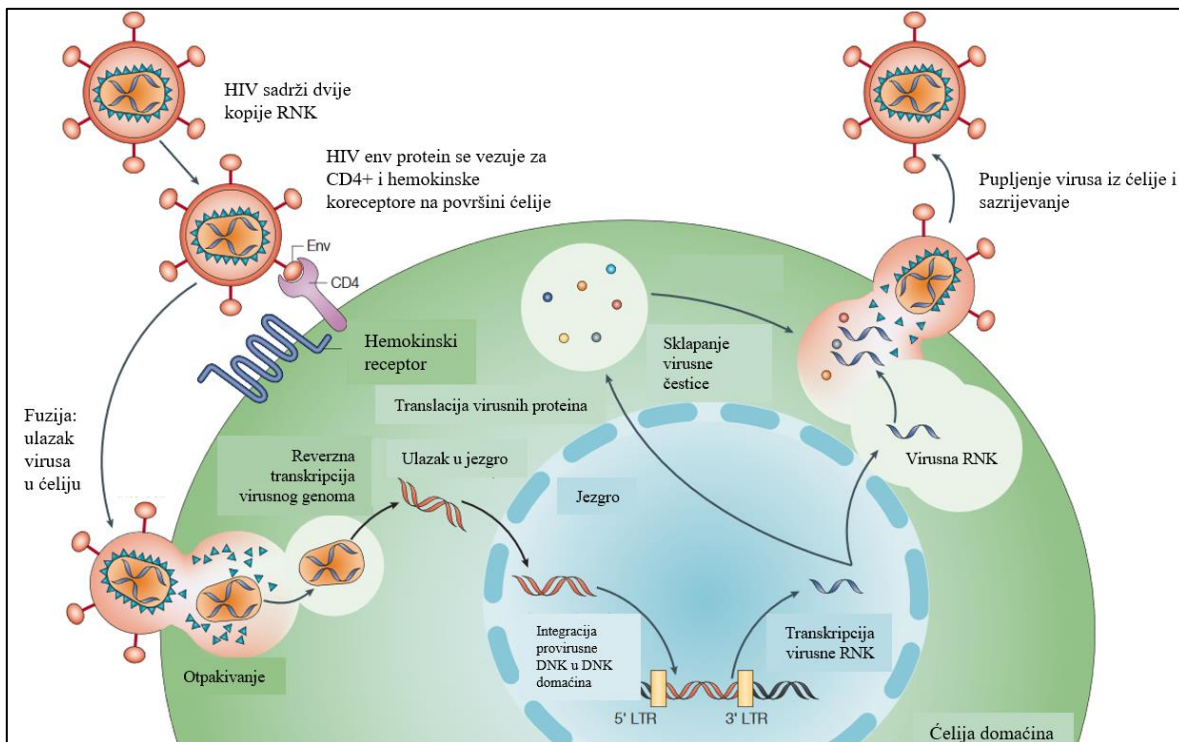
Slika 2. A) HIV-1 genom B) HIV-2 genom

(Preuzeto i prilagođeno iz: Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj B, Brutto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.* 2010;46(1):5-14)

Slično kao i kod drugih retrovirusa, *gag* gen kodira strukturne proteine jezgra (p24, p7, p6) i matriksa (p17) a *env* gen kodira glikoproteine virusnog omotača gp120 i gp41, koji prepoznaju površinske receptore ćelija. *Pol* gen kodira enzime ključne za virusnu replikaciju: reverznu transkriptazu koja pretvara virusnu RNK u DNK, integrazu koja inkorporira virusnu DNK u hromozomsku DNK domaćina (provirus) i proteazu koja cijepa velike Gag i Pol prekursore proteina u njihove komponente [20, 21].

1.2.2. Replikacija HIV-a

Ciklus replikacije HIV-a je šematski prikazan na slici 3.



Slika 3. Ciklus replikacije HIV-a

(Preuzeto i prilagođeno iz: Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews. Genetics*. 2004;5(1):52–61)

Inicijalni korak u infekciji ćelija HIV-om podrazumijeva vezivanje proteina gp120 za CD4, koji je izražen na površini ćelija kod oko 60% cirkulišućih T-limfocita, na prekursorima T-ćelija unutar koštane srži i timusa, na monocitima/makrofagama, eozinofilima, dendritskim ćelijama i mikroglialnim ćelijama centralnog nervnog sistema. Trimerni kompleks, sastavljen od heterodimernih proteina gp120 i gp41 i CD4, od suštinskog je značaja za prepoznavanje virusa i ulazak u ciljne ćelije. Protein gp41 sadrži hidrofobni peptid na svom amino kraju, koji je neophodan za fuziju virusnih i ćelijskih membrana. Nakon vezivanja gp120 sa CD4 proteinom, virus podliježe strukturnoj promjeni, eksponirajući određeni domen u gp120. Ovaj domen je prepoznat od strane hemotaktičkih citokina, tj. hemokina, malih proteina koji posreduju u navođenju i regrutovanju imunih ćelija tokom inflamacije. Hemokini receptori se klasifikuju na osnovu položaja ostataka cisteina, kao i njihovih angiogenih efekata [19, 22]. Do sada je identifikovano najmanje 17 članova hemokinskih liganda, koji funkcionišu kao HIV koreceptori. Klasifikuju se prema strukturi liganda, a trenutna nomenklatura koristi oznake: CXC, CC, CX3C ili C, nakon čega slijedi R (receptor) i broj (npr. CXCR1-5, CCR1-10, CX3CR1 itd.). Najčešći koreceptori koje koristi HIV su CXCR4 i CCR5, ali su opisani i drugi potencijalni koreceptori.

Utvrđeno je da diferencijalna ekspresija receptora hemokina na ciljnim ćelijama predstavlja glavnu determinantu tropizma HIV-1. U suštini, postoje sojevi HIV-1 koji se pretežno vezuju za β -hemokinski receptor CCR5 koji je prisutan uglavnom u makrofagama i CD4+ T-

ćelijama. Ovi sojevi su poznati i kao makrofagotropski (M-tropski) ili R5 virusi. CCR5 koriste skoro svi primarni izolati HIV-1 bez obzira na virusni genetski podtip. Nasuprot tome, drugi izolati koriste prije svega CXCR4 za ulazak i repliciranje u primarnim CD4+ T-ćelijama. Ovi sojevi su poznati kao T-limfocit-tropski (T-tropski) ili X4 virusi. α -hemokin SDF-1, ligand za CXCR4, potiskuje replikaciju T-tropskih HIV-1 virusa, konkurišući sa virusom za vezivanje na CXCR4. Na kraju, postoje HIV izolati koji se mogu vezati i za CCR5 i za CXCR4 receptore. Ovi sojevi se nazivaju dvojni tropski ili X4R5 virusi. Dvostruko vezivanje gp120 i na CD4 i na jedan hemokinski receptor omogućava stabilniju dvostruku vezu virusa, što zauzvrat dozvoljava N-terminalnom fuzionom peptidu gp41 da prođe u ćelijsku membranu [4, 17, 23].

Fuzija virusne i ćelijske membrane je preduslov za translokaciju virusnog kapsida u citoplazmu. Kapsid biva preuzet od strane endozoma nakon čega slijedi oslobađanje njegovog sadržaja u citoplazmu (otpakivanje) (Slika 3). Konverzija i integracija virusne RNK u provirusnu DNK odvija se pod dejstvom enzima reverzne transkriptaze i integraze (Slika 3). Preko svog aktivnog mjesta H na ribonukleazi, reverzna transkriptaza započinje reverznu transkripciju virusne RNK u citoplazmi koja se javlja kao minus-*strand* polimerizacija, počevši od mjesta vezivanja prajmera, dok se virusna RNK ne prepíše u hibridnu spiralu RNK - DNK. Zatim, aktivno mjesto H na ribonukleazi reverzne transkriptaze cijepa lanac RNK, a aktivno mjesto polimeraze reverzne transkriptaze kompletira DNK lanac kako bi se formirao molekul dvostrukog heliksa DNK (dsDNK), koji se integriše unutar ćelijskog genoma pomoću enzima integraze. Ovaj protein uklanja nukleotide sa oba 3' kraja dvostrukog heliksa DNK omogućavajući njihovo povezivanje, prenosi modifikovanu provirusnu DNK u ćelijsko jezgro i olakšava njegovu integraciju u genom domaćina. Integrisana HIV DNK naziva se provirus. Provirus može biti neaktivan više godina, ne proizvodeći nove kopije HIV-a ili proizvodeći tek mali broj novih kopija. Ekspresija provirusa zahtijeva da ciljna ćelija bude u aktiviranom stanju. Monociti / makrofage, mikroglialne ćelije i latentno zaražene nestacionirane CD4+ T-ćelije koje sadrže integrisani provirus su važni dugotrajni ćelijski rezervoari HIV-a. Nakon aktivacije ćelija javlja se transkripcija provirusne DNK u informacionu RNK (Slika 3). Proces transkripcije na početku dovodi do rane sinteze regulatornih HIV-1 proteina kao što su Tat i Rev. Tat se vezuju za TAR lokaciju (engl. *Transactivation Response Element* - TAR) na početku HIV-1 RNK u jezgru i stimuliše transkripciju i formiranje dužih transkripta RNK. Rev olakšava transkripciju dužih transkripta RNK i ekspresiju strukturnih i enzimskih gena i sprečava proizvodnju regulatornih proteina, stoga promovise stvaranje zrelih virusnih čestica. Virusna informaciona RNK za kodiranje dugih fragmenata migrira u citoplazmu, gdje se sintetišu strukturni proteini novih virusnih čestica (Slika 3). Sintetisani proteini su dugog lanca, prekursori, iz kojih djelovanjem HIV proteaze nastaju značajni strukturni i funkcionalni proteini. Proteini kodirani *pol* i *gag* genomom čine nukleus zrele čestice HIV. Proizvodi kodirani *env* genomom formiraju glikoproteine virusnog omotača. Veliki gp160 prekursorski molekul biva "isječen" HIV-1 proteazom u gp120 i gp41. Gag i Pol proteini se takođe dobijaju iz velikog 160 kD prekursorskog molekula, iz kojeg proteaza HIV "cijepa" p24, p17, p9 i p7 Gag finalne proizvode i Pol proteine. Cijepanje molekula prekursora od strane HIV-1 proteaze je neophodno za generisanje infektivnih virusnih čestica. Formiranje novih virusnih čestica je proces koji se vrši korak po korak: dva virusna RNK lanca se povezuju zajedno sa enzimima replikacije, dok se jezgro proteina stvara oko njih formirajući virusni

kapsid. Ova nezrela čestica migrira prema površini ćelije. Od velikih prekursorskih molekula, dejstvom HIV-1 proteaze, nastaju proteini koji izgrađuju kapsid što dovodi do stvaranja novih infektivnih virusnih čestica, koje prolaze kroz ćelijsku membranu domaćina (Slika 3), čime stiču novi omotač. U toku procesa pupljenja, lipidne membrane virusa mogu uključiti različite proteine domaćina i postati obogaćene fosfolipidima i holesterolom. Za razliku od T-limfocita, gdje se pupljenje javlja na površini ćelija, a virusne čestice se izdvajaju u ekstracelularni prostor, proces pucanja kod monocita i makrofaga rezultira akumulacijom virusnih čestica unutar intracelularnih vakuola koje se zatim oslobađaju [17, 19, 24].

1.2.3. Patogeneza i tok HIV infekcije

Postoje tri osnovna načina prenosa HIV-a. Prvi je seksualni kontakt koji podrazumijeva izlaganje epitela sluzokože spermi, vaginalnim sekretima, rektalnim sekretima ili krvi koja sadrži virus. To se obično dešava kroz nezaštićeni vaginalni ili analni odnos. Korišćenje kondoma rezultira smanjenjem prenosa virusa za 80%.

Virus se takođe može prenijeti sa majke na dijete, što se može dogoditi transplacentno, tokom porođaja usljed izlaganja genitalnim sekretima ili krvlju majke, ili putem majčinog mlijeka. Virusno opterećenje u trenutku porođaja ima ulogu u intrapartumnom prenošenju HIV-a sa majke na novorođenče. Do 40% novorođenčadi se zarazi tokom rođenja, ali brzina prenosa HIV-1 sa majke na novorođenče može se smanjiti za do 70% primjenom carskog reza.

Treći način prenosa HIV-a je putem krvi, bilo intravenskom primjenom droga, korišćenjem nepravilno sterilizovanih igala i opreme, ili slučajnim izlaganjem zaraznim materijalima [4]. Najčešći put ulaska HIV-a u organizam je seksualni kontakt ili intravensko ubrizgavanje. Rektalna i vaginalna sluznica su posebno ranjive na infekcije lentivirusima uključujući i HIV. U najranijim, asimptomatskim fazama primarne HIV infekcije, HIV inficira dendritske ćelije, makrofage i CD4+ T ćelije u *lamina propria* odmah ispod rektalnog ili vaginalnog epitela. Inficirane dendritske i T ćelije prenose virus u nove CD4+ T ćelije koje se nalaze u lokalnom limfnom čvoru, a virusna replikacija se nastavlja eksponencijalnom brzinom tako da se populacija udvostručava svakih 6–10 sati. U roku od 2–6 nedjelja od izlaganja virusu, osoba može da doživi akutnu temperaturu i simptome slične infektivnoj mononukleozi koju karakterišu osip, limfadenopatija i umor. U cirkulaciji je prisutno visoko virusno opterećenje (10^5 – 10^7 viriona / ml krvi) i značajan nivo HIV strukturnog proteina p24 se može otkriti u krvi. Inficirani limfociti sve više prenose virione u dodatna limfoidna tkiva gdje se u obilju mogu naći makrofage i T ćelije. Upravo u ovom trenutku je pojedinac, koji uopšte ne sumnja na HIV infekciju, najzarazniji. Nažalost, nivoi anti-HIV antitela kod zaražene jedinke u ovoj fazi se ne mogu otkriti standardnim serološkim procedurama. Otprilike 4–8 nedjelja nakon infekcije, odnos CD4+ T ćelija i CD8+ T ćelija se drastično smanjuje u odnosu na normalne vrijednosti od približno 2:1 usljed ubijanja CD4+ T ćelija u velikom broju i vrhunca anti-HIV CTL (engl. *Cytotoxic T lymphocyte* - CTL) odgovora. Infekcija je djelimično zadržana (ali nije u potpunosti eliminisana iz tijela), klinički simptomi se smanjuju, a viremija prestaje za oko 2 mjeseca. Međutim, cijena ove odbrane za imunološki sistem je visoka, pošto se veliki broj HIV-specifičnih CTL klonova gubi zbog klonske iscrpljenosti [19, 25, 26].

Cirkulišuća anti-HIV neutrališuća antitijela se konačno mogu detektovati 2 mjeseca nakon infekcije. U ovom trenutku, pacijent je seropozitivan na anti-HIV antitijela koja prepoznaju

virusne Gag i Env proteine kao i druge nestrukturane proteine. Kaže se da je došlo do serokonverzije. Međutim, s obzirom na to da je virus pretrpio ogromne antigene varijacije, mnoga neutrališuća antitijela sada ne prepoznaju virusne epitope. Što je još gore, antitijela koja se mogu vezati za virione mogu zauzvrat biti vezana makrofagnim Fc receptorima koji ograničavaju ulaz viriona direktno u ćelijsku populaciju koja služi kao rezervoar virusa. Veliki broj živih virusa integriše se kao provirus i u makrofage i u T ćelije, a pojedinac ulazi u period hronične infekcije, ali klinički je u latenciji. Čim se ove CD4+ T ćelije i makrofage aktiviraju, virus ponovo pokreće svoju replikaciju. Međutim, HIV specifični CTL i antitijela održavaju to stanje viremije pri kome ostali klinički znaci nisu očigledni. Kako se virus širi na sve više i više novih T ćelija u limfoidnim organima, on se replikuje i oslobađa potomstvo u količini od 10^9 – 10^{11} novih viriona dnevno. Virusno opterećenje u krvi klinički latentnih pacijenata može porasti do 10^7 molekula HIV RNK / ml plazme (ekvivalentno 5×10^6 viriona / ml krvi), ali pacijent ne postaje prekomjerno bolestan. Komponente komplementa i antitijela koja se vežu za virione su zauzvrat vezani za komplementarne receptore i Fc receptore na površini folikularnih dendritskih ćelija (engl. *follicular dendritic cells* - FDC). Neki virioni tako završavaju „zarobljeni“ na spoljnim površinama FDC u germinalnim centrima limfnih čvorova. Nastaje hiperplazija FDC mreže, a germinalni centar makrofaga i antigen specifičnih T ćelija koje kad uspostave kontakt sa FDC postaju inficirane doprinoseći daljoj replikaciji virusa. Milijarde T ćelija, čak 2×10^9 / dan, bivaju uništene. Međutim, samo 1% ubijenih CD4+ T ćelija je zapravo zaraženo virusom. Najveći dio kolapsa populacije CD4+ T ćelija tokom faze hronične infekcije nastaje zbog gubitka neinficiranih ćelija [27, 28].

Tokom faze latencije, drastični napad na CD4+ T ćelije može se djelimično nadoknaditi ogromnom snagom koštane srži za proizvodnju novih hematopoetskih ćelija. Sve dok se „broj T4“, broj CD4+ T ćelija u krvi pacijenta održava iznad 200 CD4+ T ćelija / mm^3 krvi (normalno 800–1100 CD4+ T ćelija po mm^3), zaraženi pojedinac obično ne pokazuje kliničke znake infekcije. Klinička latencija može trajati samo nekoliko mjeseci ili se može produžiti preko 16 godina. Zanimljivo je da se iz virusnog opterećenja u plazmi tokom 6 mjeseci nakon infekcije može predvidjeti koliko brzo će bolest napredovati kod određenog pacijenta. Oni sa manje od 10^5 molekula HIV RNK / ml plazme imaju veću vjerovatnoću da će preživjeti najmanje 5 godina prije nego što razviju kliničke simptome AIDS-a, dok oni sa više od 10^5 molekula HIV RNK / ml plazme imaju 10 puta veću vjerovatnoću da će se razboljeti u roku od 5 godina.

Klinička latencija se završava kada je imunološki sistem domaćina toliko oštećen da se više ne može odbraniti od oportunističkih patogena (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*...). Titar anti-HIV antitijela opada, broj anti-HIV CTL pada, virusni protein p24 se ponovo pojavljuje u krvi, a virusno opterećenje u plazmi naglo raste dok se proizvodi do 10^{10} viriona dnevno. Kako se bolest približava kasnim fazama, FDC mreža unutar limfnih čvorova se raspada i biva zamijenjena fibrotičnom i / ili masnom ćelijskom infiltracijom. Arhitektura limfnih čvorova se urušava, a virus koji je ranije, tokom infekcije, bio zarobljen u imunološkim kompleksima na površinama FDC biva oslobođen. Primijećuje se povećana viremija, a broj T4 ćelija pada ispod 200 CD4+ T ćelija / mm^3 krvi. S gubitkom FDC i CD4+ T ćelija, citokinski profili se mijenjaju i drastično je ugrožen kapacitet za postavljanje adaptivnih imunoloških odgovora. Kada pacijent ima broj T4 manji od 50 CD4+ T ćelija / mm^3 (tj. kada je blizu 90% normalne

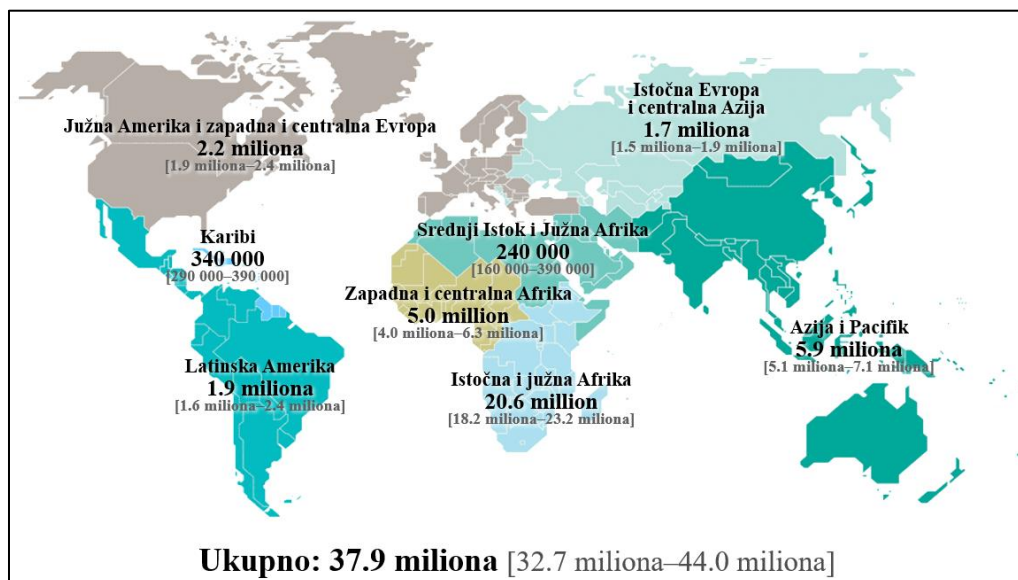
populacije T ćelija uništeno) i u odsustvu antiretrovirusne terapije, uslijediće smrt [29, 30, 31].

1.2.4. Epidemiologija

Oko 37,9 miliona ljudi je u 2018. godini živjelo sa HIV-om, od čega 1,7 miliona djece ispod 15 godina. Afrički region je najviše pogođen ovim virusom i to istočna i južna Afrika, sa 20,6 miliona ljudi (Slika 4).

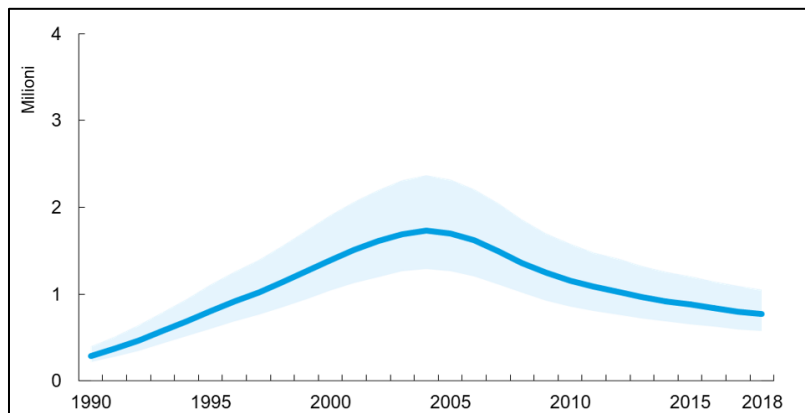
Kada je riječ o novoinficiranim slučajevima njih je u 2018. godini bilo 1,7 miliona ili, drugim riječima, 5 000 novoinficiranih na dan. Čak 61% od navedenog broja je iz sup-saharskog regiona. Broj novoinficiranih je smanjen za 40% u odnosu na pik iz 1997. godine kada je iznosio 2,9 miliona. Projekcije SZO su da će do 2030. godine biti manje od 200 000 novoinficiranih HIV-om.

Od početka epidemije, pa sve do kraja 2018. godine, ukupno 74,9 miliona ljudi je bilo inficirano HIV-om.



Slika 4. Prikaz broja ljudi koji žive sa HIV-om na globalnom nivou u 2018. godini (Preuzeto i prilagođeno iz UNAIDS [homepage on the Internet] UNAIDS; c2020 [cited 2020 Jan 19]. Available from: <https://www.unaids.org/en>)

U 2018. godini oko 770 000 ljudi je umrlo od bolesti povezanih sa HIV-om, od čega su 100 000 bila djeca mlađa od 15 godina. Od početka osamdesetih godina dvadesetog vijeka, kada je AIDS identifikovan, pa sve do 2018. godine, ova bolest je prouzrokovala oko 32 miliona smrtnih slučajeva širom svijeta (Slika 5). Tuberkuloza predstavlja glavni uzrok smrti među ljudima koji žive sa HIV-om; približno jedna od tri smrti povezanih sa AIDS-om je zbog tuberkuloze.



Slika 5. Prikaz broja smrtnih slučajeva uzrokovanih AIDS-om na globalnom nivou od 1990. do 2018. godine

(Preuzeto i prilagođeno iz UNAIDS [homepage on the Internet] UNAIDS; c2020 [cited 2020 Jan 19]. Available from: <https://www.unaids.org/en>)

Široka primjena ART na globalnom nivou je glavni razlog pada broja smrtnih slučajeva vezanih za HIV za čak 56% u odnosu na pik iz 2004. godine (1,7 miliona). Do sredine 2019. godine, oko 24,5 miliona ljudi primalo je ART, dok je taj broj u 2010. godini bio 7,7 miliona. Cilj liječenja HIV infekcije u budućnosti je povećanje obima i kvaliteta terapije kao i rad na prevenciji, dijagnozi i kontinuiranoj njezi [1].

1.2.5. Anti-HIV lijekovi

Ciljna mjesta na koje djeluju anti-HIV lijekovi su procesi katalizovani enzimima. Reverzna transkripcija je proces koji katalizuje reverzna transkriptaza (RT) (RNK zavisna DNK polimeraza), specifični virusni enzim koji vrši reverznu transkripciju virusne jednolančane RNK na dvostruku provirusnu DNK. Sa druge strane, “proteolitička obrada” je proces koji katalizuje virusna proteaza, enzim koji cijepa virusni poliprotein u manje, zrele (strukturalne i funkcionalne) virusne proteine. Polazeći od navedenog, anti-HIV lijekovi se, u zavisnosti od ciljnog mjesta dejstva, dijele u dvije glavne klase: inhibitori reverzne transkriptaze i inhibitori proteaze. Inhibitori reverzne transkriptaze se dalje dijele u dvije grupe: nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (zidovudin, stavudin, didanozin, zalcitabin, lamivudin, adefovir i abakavir, lobukavir, tenofovir) i nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (nevirapin, delavirdin, efavirenc).

Ostali, manje zastupljeni ciljni procesi na koje djeluju anti-HIV lijekovi su: ulazak virusa, posebno fuzija virus-ćelija i interakcija virusa sa njegovim (ko-)receptorima, kao i integracija provirusne DNK u genom ćelije domaćina (proces koji je katalizovan od strane specifičnog virusnog enzima, integraze) [19].

Zbog velike genetičke varijabilnosti HIV-a javlja se potreba za korištenjem kombinovane terapije – tzv. visokoaktivne antiretrovirusne terapije, koja podrazumijeva kombinaciju tri (ili više) antiretrovirusnih lijekova. Preporučuje se kombinacija dva lijeka iz grupe

nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze i jednog lijeka iz grupe nenukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze ili jednog ili dva lijeka iz grupe inhibitora proteaza.

Kombinacija više antiretrovirusnih lijekova ima za cilj: (i) postizanje sinergizma između različitih lijekova koji djeluju na različita ciljna mjesta dejstva; (ii) smanjenje pojedinačne doze lijekova kako bi se smanjila njihova toksičnost; (iii) smanjenje vjerovatnoće razvoja rezistencije na lijekove [26].

Nedavne studije pokazale su da ako se HAART primijeni u ranim fazama i koristi u kontinuitetu, šansa da pacijent preživi 5 godina je najmanje 90%. Međutim, primjena HAART ima određene nedostatke. Pacijenti se često suočavaju sa složenim zahtjevima po pitanju adherence, kao i neželjenim dejstvima [32].

Nažalost, HAART ne eliminiše HIV-1, a rezistentni sojevi se često pojavljuju kao rezultat dugotrajnog liječenja. Pacijenti sa AIDS koji primaju HAART terapiju i dalje mogu prenijeti virus. Uprkos liječenju, pacijenti i dalje pokazuju različite faze napredovanja bolesti [33].

Dostupnost HAART terapije i njena isplativost glavna su briga s kojom se suočavaju najsiromašnije zemlje na svijetu u kojima živi više od 70% oboljelih od AIDS-a. Zbog toga i dalje postoji potreba za sintezom novih anti-HIV lijekova [34].

1.2.5.1. Inhibitori reverzne transkriptaze

1.2.5.1.1. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze

Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze djeluju na principima kompetitivne inhibicije i prijevremenog prekida lanca DNK. Strukturno, to su 2',3'-dideoksinukleozidni analozi uobičajenih 2'-deoksinukleozida koje reverzna transkriptaza spaja u cilju sinteze DNK. Ako je 3' hidroksi grupa nukleozida zamijenjena azido grupom ili vodonikom, produženje lanca rastuće virusne DNK se prekida jer ne postoji 3' OH grupa na koju se može pridružiti sljedeći nukleozid. Štaviše, mjesto vezivanja supstrata u reverznoj transkriptazi čvrsto je zauzeto inhibitorom. Konačno, može biti prisutno toliko molekula inhibitora da je enzimu jednostavno teško naći svoj prirodni supstrat. Najčešće korišćeni nukleozidni inhibitori su zidovudin (uobičajeno poznat kao AZT, azidotimidin), stavudin, lamivudin (3TC), abakavir i didanozin. Nažalost, pacijenti koji uzimaju inhibitore reverzne transkriptaze često doživljavaju neželjena dejstva kao što su: lipodistrofija, laktatna acidoza, supresija koštane srži, periferna neuropatija, miopatija, ulcerozne promjene u ustima, mučnina i povraćanje [35].

1.2.5.1.2. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze

Za razliku od nukleozidnih inhibitora, nenukleozidni inhibitori djeluju na enzim reverznu transkriptazu na lokacijama udaljenim od aktivnog mjesta. Ovi inhibitori su raznovrsne strukture, ali dijele karakteristiku da indukuju velike konformacione promjene molekula reverzne transkriptaze koji remete njegovu enzimsku aktivnost. Uobičajeni nenukleozidni inhibitori su nevirapin i efavirenz, lijekovi koje pacijenti bolje podnose nego inhibitore proteaze i nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze. Neželjena dejstva uključuju: hiperlipidemiju, lipodistrofiju i dijabetes melitus [35].

1.2.5.2. Inhibitori HIV proteaze

Specifični inhibitori HIV proteaze su razvijeni na osnovu detaljnog poznavanja strukture enzima i njegovog supstrata. Dizajnirani su tako da se vezuju za virusnu proteazu sa visokim afinitetom, formirajući hidrofobne veze, pri čemu imaju tendenciju da zauzimaju više prostora od prirodnih supstrata.

1.2.5.2.1. Struktura i funkcija HIV proteaze

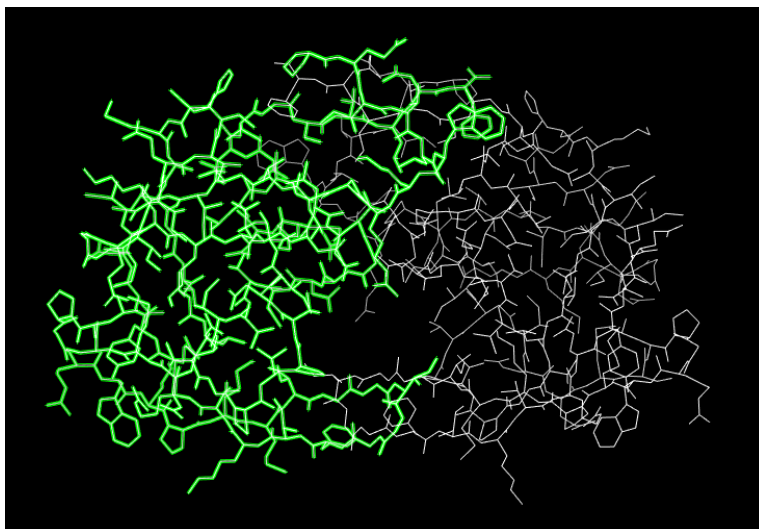
HIV proteaza igra ključnu ulogu u životnom ciklusu virusa. Ona generiše zrele infektivne čestice virusa putem cijepanja virusnih Gag i GagPol prekursorskih poliproteina. Prekursor GagPol nastaje preko -1 ribozomskog okvira, čija zastupljenost iznosi oko 5-10%. Iz ovog prekursora nastaju: MA, CA, p2, NC, *transframe* protein (TFP) i virusni enzimi: proteaza, reverzna transkriptaza i integreza [36].

HIV-1 proteaza prepoznaje asimetrični oblik peptidnih supstrata, a ne određenu aminokiselinsku sekvencu. Smatra se da male razlike u strukturi peptida doprinose visoko uređenom i regulisanom procesu u kojem se sva pojedinačna cijepanja javljaju različitim brzinama. Prvo cijepanje se odvija na C-terminalnom kraju p2 (MA-CA-p2 ↓ NC-p1-p6), a naknadnim cijepanjima se odvaja MA od CA-p2 (MA ↓ CA-p2) i NC-p1 od p6 (NC -p1 ↓ p6). Razdvajanje malih *spacer* proteina p2 (CA ↓ p2) i p1 (NC ↓ p1) su završna i brzinski ograničavajuća cijepanja [37].

Iako je većina studija istraživala uticaj sekvence supstrata na p4-p3' pozicije, koje su u direktnom kontaktu sa virusnom proteazom, dokazano je da i udaljenije p4' i p5' pozicije takođe utiču na efikasnost cijepanja [38].

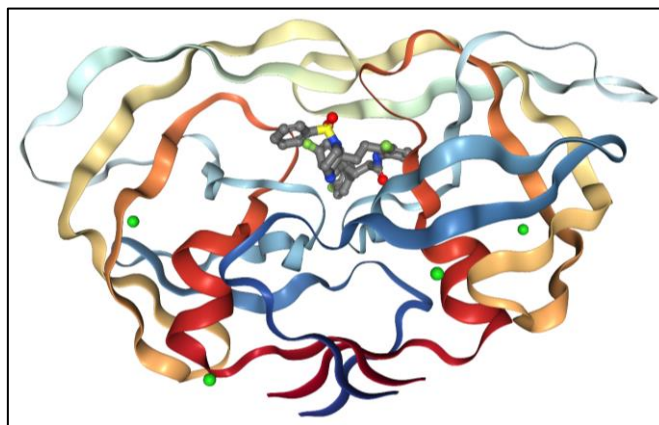
Virusna proteaza cijepa dva proteinska prekursora koji se akumuliraju na plazma membrani tokom ili kratko nakon što se sakupljene čestice virusa oslobađaju iz zaraženih ćelija. Dakle, aktivnost HIV proteaze nije potrebna za proizvodnju i otpuštanje virusa *per se*, ali je od suštinskog značaja za virusno sazrijevanje koje dovodi do stvaranja infektivnih virusnih čestica.

HIV proteaza pripada familiji asparaginskih proteaza i simetrični je homodimer koji se sastoji od dvije identične podjedinice od po 99 aminokiselina: monomer (lanac) A i monomer (lanac) B (Slika 6) [39].



Slika 6. Grafički prikaz lanca A (označen zelenom bojom) i lanca B (označen bijelom bojom) enzima HIV proteaze

Navia i saradnici iz Merck laboratorije su prvi definisali kristalografsku strukturu HIV proteaze [40]. Kristalografsku analizu visoke rezolucije kasnije su izveli Kent i saradnici [41]. Na slici 7. prikazan je kompleks enzimskog homodimera sa ligandom (*S*)-*N*-(3-fluoro-2-(2-(1-(fenilsulfonyl)piperazin-2-yl)etil)fenil)-3,3-bis(4-fluorofenil)propanamid (PDB: 6B36):



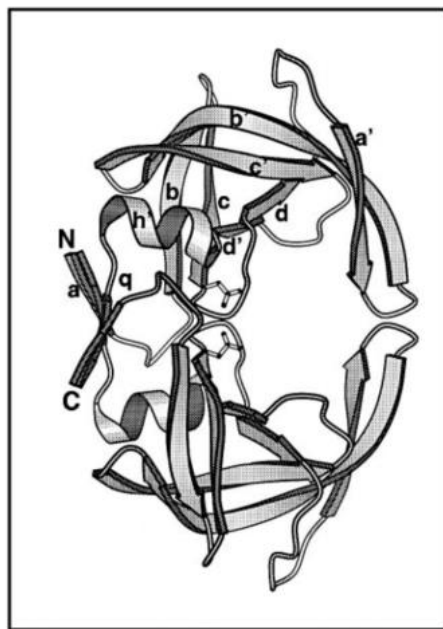
Slika 7. Struktura kompleksa HIV proteaze sa ligandom (*S*)-*N*-(3-fluoro-2-(2-(1-(fenilsulfonyl)piperazin-2-yl)etil)fenil)-3,3-bis(4-fluorofenil)propanamid (PDB: 6B36)

Biološki aktivni oblik enzima je C_2 -simetrični dimer, pri čemu je svaki monomer, pojedinačno neaktivan; N- i C- terminalni ostaci monomera uzajamno blisko interaguju formirajući β -ploču.

Svaki monomer sadrži zaklonjenu sekvencu od tri aminokiselinska ostatka (Asp25-Thr26-Gly27, odnosno Asp25'-Thr26'-Gly27'). Ključnu ulogu u hidrolizi Phe-Pro peptidne veze

virusa imaju Asp25 i Asp25' aminokiselinski ostaci. Uloga ostalih aminokiselina (Thr26, Thr26'; Gly27, Gly27') aktivnog mjesta je još uvijek nepoznata. Aktivno mjesto enzima smješteno je na dodirnoj površini dvije subjedinice. Dio svakog monomera je i najfleksibilniji dio proteina koji se konformaciono mijenja usljed vezivanja enzima za inhibitor ili supstrat. Konformacija kompleksa proteaze i inhibitora razlikuje se od konformacije kompleksa proteaze i supstrata [39].

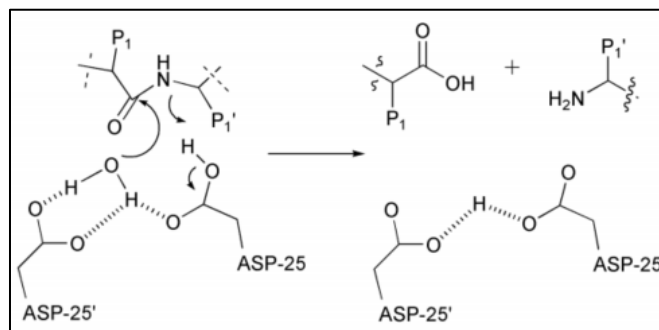
N-terminalni dio β niza a (ostaci 1–4) formira spoljni dio interfejsa β ploče. β niz b (ostaci 9–15) nastavlja se do prelaska u β niz c, koji se završava na aktivnom mjestu (Asp25-Thr26-Gly27). Iz aktivnog mjesta polazi β niz d, koji sadrži ostatke 30–35. Kod proteaza sličnih pepsinu, na β niz d se natavlja heliks h, što je takođe primijećeno u proteazi virusa infektivne anemije konja (engl. *equine infectious anemia virus* - EIAV). U HIV-1 proteazi, ovaj segment je prilično iskrivljen i formira široku petlju (ostaci 36–42). Druga polovina molekule je topološki slična sa prvom polovinom i intramolekulski simetrična. Ostaci 43–49 formiraju β niz a' koji pripada spoljašnjoj površini (preklopnici). Drugi niz preklopnice (ostaci 52–58) sa još 8 aminokiselina čini dio dugog β lanca b' (ostaci 52–66). β lanac c' sadrži ostatke 69–78 i, nakon petlje od tri aminokiseline (79–82), nastavlja se niz d' (ostaci 83–85), koji vodi direktno do dobro definisanog heliksa h' (ostaci 86–94). Poslije heliksa h' slijedi C-terminalni niz (ostaci 95–99), koji se može označiti kao q i koji čini unutrašnji dio dimera. Četiri β niza u molekulskom jezgru su organizovana u ψ ploču koja je karakteristična za sve asparaginske proteaze. Jedna od ψ ploča sadrži lance c (ostaci 23–25), d i d', a druga se sastoji od nizova c' (ostaci 76–78), d' i d (Slika 8) [42].



Slika 8. Grafički prikaz HIV proteaze sa označenim elementima sekundarne strukture (Preuzeto i prilagođeno iz: Wlodawer A, Vondrasek J. Inhibitors of HIV-1 protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 2009; 27(1):249–284)

Precizni mehanizam kojim se aktivira virusna proteaza nije u potpunosti otkriven, iako je poznato da je potrebna dimerizacija GagPol prekursorskih proteina. Uprkos svojoj kritičnoj funkciji u virusnom sazrijevanju i infektivnosti, HIV proteaza je pokazala veliku fleksibilnost, a na jednoj trećini od 99 aminokiselina je primijećen polimorfizam. Smatra se da do hidrolize peptidne veze dolazi nukleofilnom adicijom hidroksilnog jona koji nastaje aktivacijom molekula vode vezane za Asp-ostatak u katalitičkom mjestu HIV-proteaze. Neprotonovani Asp25'-ostatak ponaša se kao baza, prihvata proton iz molekule vode, pri čemu nastaje nukleofilni hidroksilni jon koji napada karbonilni kiseonik iz peptidne veze. Asp25-ostatak se ponaša kao kiselina koja predaje proton amidskoj grupi peptidnog supstrata i gradi tetraedarski intermedijer. Dolazi do cijepanja peptida, a Asp25-ostatak preuzima proton i vraća se u početnu konfiguraciju [39].

Iako HIV proteaza ima mnoge zajedničke karakteristike sa ostatkom familije aspartil proteaza, detaljni mehanizam dejstva ovog enzima ostaje nerazjašnjen u potpunosti. Jaskolski i saradnici predložili su novi model enzimskog mehanizma HIV proteaze zasnovan na kristalnoj strukturi kompleksa između hemijski sintetisane proteaze i oktapeptidnog inhibitora U-85548e (H-Val-Ser-Gln-Asn-Leu-ψ-[CH(OH)-CH₂]-Val-Ile-Val-OH), kao i druge kristalne strukture HIV proteaze kompleksirane sa različitim inhibitorima. U ovom mehanizmu (Slika 9) reakcija hidrolize se posmatra kao proces u jednom koraku tokom kojeg nukleofilni molekul vode i kiseli proton zajednički napadaju peptidnu vezu.



Slika 9. Predloženi katalitički mehanizam HIV proteaze

Istovremeni napad nukleofila i elektrofila je glavna razlika između ovog mehanizma i drugih ranije predloženih mehanizama [43, 44, 45].

Kao i u slučaju cijele familije aspartil proteaza, mogućnost kovalentne katalize (npr. Asp25 napada direktno karbonilnu grupu amidne veze) u hemijskom mehanizmu HIV proteaze se odbacuje. Hiland i saradnici pružili su dokaze protiv stvaranja kovalentnog intermedijera proučavanjem vezivanja ¹⁸O u transpeptidni proizvod reakcije između supstrata: AcSKNIFLDG-NH₂ (iz AcSKNIPVV-NH₂ i FLDG-NH₂) i HIV proteaze (reakcije se izvodi u vodi obogaćenoj sa H₂¹⁸O). Kako se ugradnja ¹⁸O u supstrat AcSKNIPVV-NH₂ može posmatrati pod uslovom da je ponovno formiranje supstrata posle hidrolize zanemarljivo, učešće acilenzim intermedijera može biti isključeno. Ovim studijama je takođe utvrđeno da se reakcija promjena ¹⁸O (iz H₂¹⁸O) u ponovo formiranom supstratu odvija brzinom 0,01-0,012 puta većom od stope hidrolize. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa formiranjem

intermedijera amid hidrata vezanog za enzim, čija je razgradnja hemijski korak koji ograničava brzinu reakcije [46].

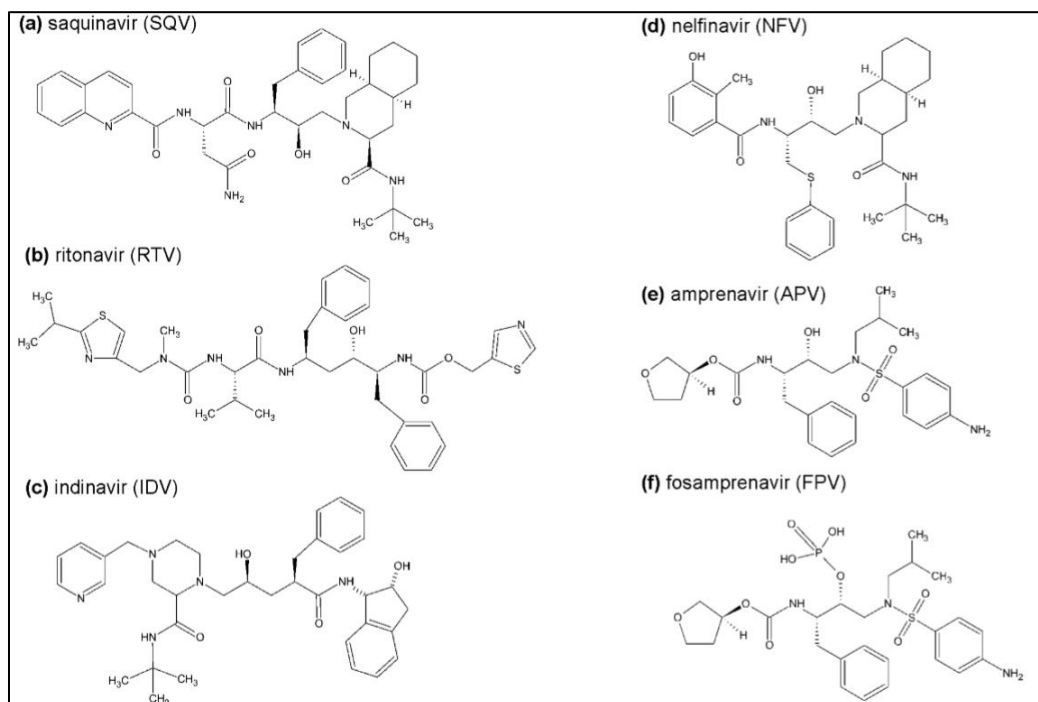
1.2.5.2.2. Inhibitori HIV proteaze

Detaljno poznavanje strukture HIV proteaze i njenog supstrata dovelo je do razvoja specifičnih inhibitora proteaza. Inhibitori HIV proteaze su dizajnirani tako da se vezuju za virusnu proteazu sa visokim afinitetom, pri čemu imaju tendenciju da zauzimaju više prostora od prirodnih supstrata. Veze između proteaze i inhibitora najčešće su hidrofobne i slične su vezama između enzima i prirodnog supstrata.

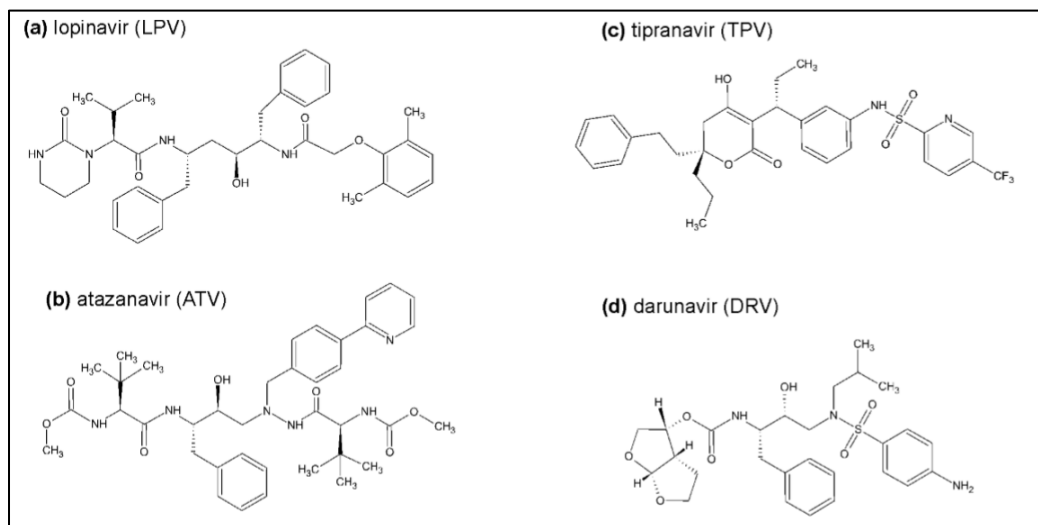
U komercijalno dostupnim lijekovima, kao i nekim od inhibitora koji se trenutno klinički ispituju, kao osnovno jezgro za razvoj korišćena je nehidrolizujuća hidroksietilenska ili hidroksietilaminska grupa. Takođe, korišćeni su i drugi izosteri u prelaznom stanju, uključujući statin, norstatin, fosfinat, redukovani amid, dihidroksietilen, α -keto amid i, u novije vrijeme, inhibitori na bazi silicijuma. U osnovi, jezgro je dobra izosterna zamjena hidrolizujuće veze za koju se vjeruje da oponaša tetraedarsko prelazno stanje proteolitčke reakcije. Razvijeno je više od 2 000 inhibitora, a većina efikasnih inhibitora sadrži strukturu jezgra koja imitira prelazno stanje proteazne katalize. U kristalnim strukturama HIV-1 proteaze kompleksirane sa ovim inhibitorima, centralna hidroksilna grupa jezgra nalazi se između Asp25 i Asp25' i ostvaruje povoljne elektrostatičke kontakte. Pokazano je da interakcija između dva katalitička aspartata i hidroksi grupe iznosi više od 4 kcal mol⁻¹ [22]. U upotrebi se nalazi više inhibitora proteaze: sakvinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir, darunavir. Većina inhibitora proteaze se propisuje istovremeno sa malom dozom ritonavira koji služi kao sredstvo za pojačavanje dejstva. Svi navedeni lijekovi, sa izuzetkom tipranavira, su kompetitivni peptidomimetički inhibitori koji, zbog strukturne sličnosti, oponašaju prirodni supstrat virusne proteaze. Peptidomimetički inhibitori sadrže jezgro hidroksietilena, koji sprečava razgradnju kompleksa inhibitora i HIV-1 proteaze. Umjesto peptidomimetičkog hidroksietilenskog jezgra, tipranavir sadrži dihidropironski prsten kao centralni skelet [38].

Svi inhibitori proteaze u sadašnjoj kliničkoj praksi odobreni su samo za oralnu primjenu, ali njihova apsorpcija u gastrointestinalnom traktu i difuzija kroz biološke membrane je obično slaba do umjerena. Ovaj efekat nastaje dijelom zbog vezivanja za P-glikoprotein sa posljedičnim efluksom lijeka, a dijelom zbog velikog vezivanja za proteine u plazmi (90-99%). Slaba apsorpcija i difuzija dovode do niske efektivne koncentracije, naročito u centralnom nervnom sistemu i genitalnom traktu. U cilju suzbijanja virusne infekcije, adekvatna inhibitorna koncentracija lijekova mora biti postignuta i održavana u krvotoku, kao i na mjestima specifičnim za virus. Niže koncentracije lijekova na ciljnim mjestima mogu dovesti do kontinuirane replikacije virusa i omogućiti pojavu varijanti virusa koji su rezistentni na lijekove. Stoga je veoma važno što se mnoga farmakokinetička ograničenja inhibitora proteaze mogu djelimično prevazići uz istovremenu primjenu niskih doza farmakokinetičkog pojačivača, snažnog inhibitora citohroma P450, kao što je ritonavir. Terapija inhibitorima proteaze koja je pojačana ritonavirovom dovodi do pojednostavljenog režima liječenja, a time i bolje adherence pacijenta [47].

Inhibitori proteaze se dijele na lijekove prve generacije (Slika 10) i lijekove druge generacije (Slika 11).



Slika 10. Inhibitori HIV proteaze prve generacije



Slika 11. Inhibitori HIV proteaze druge generacije

Inhibitori proteaze prve generacije obuhvataju: sakvinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV) i amprenavir (APV). Inhibitori prve generacije su strukturno

hidroksietilen i hidroksietilamin izosteri. Centralna hidroksilna grupa se vezuje za katalitičke ostatke asparaginske kiseline i oponaša prelazno stanje, koje postoji tokom hidrolize. Takođe su korišteni i drugi izosteri prelaznog stanja (fosfinat, redukovani amid, dihidroksietilen, α -keto amid i, u novije vrijeme, inhibitori na bazi silicijuma) za koje se vjeruje da oponašaju tetraedarsko prelazno stanje proteolitičke reakcije.

Sakvinavir, koji je razvijen od strane farmaceutske kompanije Hoffmann-La Roche, je prvi lijek koji je 1995. godine odobren od FDA za liječenje AIDS. Ovaj snažni inhibitor ($K_i = 0,12$ nM) ima hidroksietilamin kao izosternu zamjenu za Phe-Pro, koji inače predstavlja mjesto hidrolize. Struktura ovog inhibitora bila je prilično zanimljiva jer ima R konfiguraciju ugljenika koji nosi centralnu hidroksi grupu, što je bilo jedinstveno među asparaginskim inhibitorima proteaze koji su bili poznati u to vrijeme [48]. Uprkos jakom *in vitro* antivirusnom djelovanju, klinička efikasnost ovog lijeka je značajno smanjena zbog nedovoljne biorasploživosti (manje od 4%) i intenzivnog hepatičnog metabolizma. Da bi se poboljšala biorasploživost sakvinavira, razvijena je nova formulacija lijeka u obliku mekih kapsula (prethodno su bile dostupne tvrde kapsule), a nešto kasnije i formulacija sa ritonaviro. Tipične primarne mutacije koje dovode do rezistencije na sakvinavir su G48V ili L90M. Najčešća prijavljena neželjena dejstva ovog lijeka su gastrointestinalne smetnje poput dijareje, mučnine ili nelagode u stomaku [47]. Sakvinavir je označio početak HAART terapije uvođenjem inhibitora proteaze u kliničku primjenu. Nakon sakvinavira, razvijen je čitav niz inhibitora prve generacije.

Sljedeći u nizu novih lijekova je bio ritonavir koji je razvijen od strane farmaceutske kompanije Abbott. Lijek je dobio odobrenje FDA 1996. godine. Iako se proces dizajniranja lijekova prvobitno koncentrisao na C-2 simetrične molekule, struktura kompleksa inhibitor - enzim pokazala je da čak i najaktivnije C-2 simetrično jedinjenje gubi simetriju kada se veže za aktivno mjesto enzima. Dodatno, C-2 simetrična jedinjenja bila su osjetljivija na razvoj otpornosti na proteazu jer je svaka mutacija u proteazi uticala na vezivanje inhibitora dva puta. Stoga je konačna struktura inhibitora asimetrična, a različitim modifikacijama krajnjih grupa postignuta je bolja biorasploživost. Ritonavir inhibira i HIV-1 i HIV-2 proteaze. *In vivo*, glavne posmatrane mutacije koje smanjuju osjetljivost enzima na ritonavir su I84V i V82A. Ritonavir je prvobitno odobren kao antiretrovirusni lijek, ali zbog učestalih pojava neželjenih dejstava (poput gastrointestinalnih simptoma kao što su mučnina, abdominalgija i dijareja) i visoke unakrsne rezistencije sa drugim inhibitorima proteaze, njegova upotreba kao inhibitora HIV proteaze postepeno je napuštena. Neočekivano, pokazalo se da je ritonavir moćan inhibitor citohroma P-450 3A4, mikrozomalnog enzima jetre odgovornog za najveći dio metabolizma drugih inhibitora proteaze (kao i drugih ksenobiotika). Stoga se ritonavir trenutno koristi gotovo isključivo kao farmakokinetičko sredstvo za pojačavanje koje povećava koncentraciju drugih inhibitora proteaze u plazmi i tako produžava njihove terapijske efekte [42].

Terapijska efikasnost inhibitora proteaze prve generacije je ograničena. Mnogi od ovih inhibitora su strukturno peptidomimetici što znači da su metabolički nestabilni, imaju kratak poluzivot i uglavnom lošu oralnu biorasploživost, što opet zahtijeva češće doziranje. Štaviše, gastrointestinalne tegobe, uključujući mučninu, dijareju i abdominalni bol, su uobičajena neželjena dejstva inhibitora proteaze prve generacije. Ono što je najvažnije, pojava sojeva HIV-a rezistentnih na lijekove bio je glavni problem inhibitora proteaze prve

generacije. Istraživački napori usmjereni na rješavanje ovih pitanja doveli su do razvoja inhibitora proteaze druge generacije.

Inhibitori proteaze druge generacije obuhvataju: fosamprenavir (FPV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), darunavir (DRV) i tipranavir (TPV).

Inhibitori proteaze druge generacije su dizajnirani tako da inhibiraju HIV proteaze koje su rezistentne na inhibitore prve generacije a da se istovremeno dobro tolerišu, imaju minimalna neželjena dejstva i jednostavnije doziraju (jednom dnevno), što može poboljšati adherencu [48].

Lopinavir je inhibitor druge generacije koji se najčešće koristi kod pacijenata koji prethodno nisu koristili lijekove. Razvijen je od strane farmaceutske kompanije Abbott, u cilju poboljšanja karakteristike ritonavira. Od 2000. godine je u prometu u fiksnoj kombinaciji sa ritonavinom. Lopinavir je dizajniran tako da inhibira rezistentne proteaze koje sadrže zajedničku mutaciju V82A. Molekularni dizajn lopinavira je zasnovan na strukturi ritonavira i počeo je eliminacijom P3 izopropiltiazolilne grupe ritonavira koja je interagovala sa V82 ostatkom proteaze divljeg tipa. Dalja zamjena tiazolilmetoksikarbonilne grupe u P2' sa dimetilfenoksiacetilnom grupom dovela je do sinteze lopinavira. Rezistencija koju HIV proteaza razvija na lopinavir povezana je sa mutacijama koje se dešavaju na položaju devet do jedanaest („rezultat mutacije lopinavira“). Takođe, registrovana je i pojedinačna mutacija I47A, koja doprinosi smanjenoj osjetljivosti HIV-1, kao i HIV-2 proteaze na lopinavir. Neželjena dejstva lopinavira su slična kao i kod ostalih inhibitora HIV proteaze: gastrointestinalna neželjena dejstva, kao što su abdominalni bol, flatulencija, dijareja i poremećaji metabolizma poput hiperholesterolemije i hipertrigliceridemije [47].

Jedan od posljednjih u nizu odobrenih inhibitora HIV proteaze je darunavir, koji je dozvolu za stavljanje u promet dobio od strane FDA 2006. godine i to za odrasle pacijente koji su već liječeni, da bi dozvola tokom 2008. i 2013. godine bila proširena i za liječenje prethodno neliječenih pacijenata i pedijatrijskih pacijenata. Darunavir je u prekliničkim studijama pokazao potencijal protiv višestruko rezistentnih sojeva HIV-a sa visokom genetskom barijerom za razvoj rezistencije. Međutim, varijante proteaze rezistentne na više lijekova su se pojavile i kod pacijenata koji su koristili darunavir [48].

Razvoj i klinička primjena specifičnih inhibitora HIV proteaze, gotovo odmah nakon identifikacije HIV proteaze kao ciljnog mjesta dejstva, predstavlja izvanredan i možda jedan od najuspješnijih primjera racionalnog dizajna lijekova u istoriji biomedicine. Svakako, i pored postojećih lijekova postoji stalna potreba za razvijanjem bezbjednijih, jeftinijih lijekova, efikasnih protiv multirezistentnih sojeva virusa, sa visokom antivirusnom aktivnošću, boljim farmakokinetičkim osobinama, uz postizanje bolje komplijanse kroz rjeđe doziranje i manje ispoljavanje neželjenih dejstava.

Imajući u vidu činjenicu da su inhibitori HIV proteaze lipofilna jedinjenja koja imaju malu bioraspoloživost i kratko biološko poluvrijeme eliminacije, osnovni ciljevi u razvoju novih inhibitora HIV proteaze su:

- povećanje hidrofilitnosti;
- povećanje bioraspoloživosti;
- povećanje metaboličke stabilnosti;
- borba protiv multirezistentnih sojeva HIV proteaze.

1.2.5.2.3. Rezistencija na inhibitore HIV-1 proteaze

HIV-1 proteaza je u velikoj mjeri sklona razvoju rezistencije, zbog procesa u kojem se sintetiše (*in vivo* sinteza). Reverzna transkriptaza stvara virusnu DNK iz virusne RNK koja se ugrađuje u ćeliju domaćina tokom infekcije. Virusnoj reverznoj transkriptazi nedostaje funkcija korekcije. Transkripcija niske povjerljivosti povećava brzinu spontane mutageneze [48]. Virusna rezistencija na inhibitore proteaze nastaje mutacijama gena proteaza. Većina mutacija povezanih sa rezistencijom su supstitucije pojedinačnih aminokiselina.

Postoje tri kategorije mutacija:

- Pojedinačne supstitucije u reziduama šupljine aktivnog mjesta. Ovo je direktan način smanjenja afiniteta vezivanja lijekova, a koji još uvijek održava katalitičku aktivnost. Poznate mutacije koje se odnose na ovaj mehanizam uključuju: D30N, V32I, I47V, G48V, I50V, Val82 i I84V. Ove mutacije dovode do malih promjena u veličini i obliku bočnih lanaca aminokiselina koji su u interakciji sa inhibitorima.
- Prekid interakcije između dvije podjedinice u dimeru. Rezultat je povećana dimerna disocijacija i oslobađanje vezanog inhibitora. Ovaj mehanizam je opisan za mutante sa L24I, I50V i F53L u kinetičkim i strukturalnim studijama.
- Distalne mutacije koje mogu izazvati otpornost na jedinstven način. Mnoge distalne mutacije klasifikovane su kao manje mutacije koje moduliraju efekte glavnih mutacija. Jedan primer je G73S, koji je pokazao izmijenjenu mrežu interakcija koje vode do mjesta vezivanja inhibitora. Drugi indirektni efekat primijećen je za distalnu mutaciju N88D, koja je izmijenila interakciju sa vodom u očuvanom području strukture proteaze [49].

Jedan od glavnih izazova prilikom dizajniranja novih inhibitora HIV proteaze svakako predstavlja razvoj inhibitora koji će biti efikasni kod sojeva koji pokazuju multirezistenciju.

1.3. Molekulski *docking*

Emil Fišer je 1894. godine predložio da se specifičnost enzima u odnosu na njegov supstrat zasniva na komplementarnosti njihovih geometrijskih oblika koji se savršeno uklapaju nalik "ključu i bravi". Po ovoj teoriji, "brava" predstavlja enzim, a "ključ" supstrat ili neki drugi mali molekulski ligand. U takvim sistemima, uslov je da se "ključ" adekvatno uklapa u ključnu rupu (aktivno mjesto / vezivni džep) "brave" (enzima / receptora) da bi došlo do biološkog odgovora [50].

Međutim, enzimi pokazuju konformacionu fleksibilnost. Daniel Koshland je 1958. godine predložio model "indukovanog fitovanja" koji konceptualizuje "bravu" (enzim) kao dinamički entitet, pri čemu "ključ" (supstrat) modulira oblik "brave". "Indukovano fitovanje" uzima u obzir da određeni ligandi nisu supstrati za enzim - iako naizgled zadovoljavaju specifične zahtjeve vezane za aktivno mjesto.

Nedavni modeli opisuju proteine kao skup različitih konformacionih stanja (*conformation ensemble model*). Fleksibilnost proteina omogućava mu da se prebacuje iz jednog konformacionog stanja u drugo [51].

Navedeni modeli nijesu kontradiktorni. Svaki od njih se fokusira na određeni aspekt procesa molekulskog prepoznavanja. Model ključa i brave uvodi princip 3D komplementarnosti, model indukovanog fitovanja objašnjava kako se komplementarnost postiže, a *conformation ensemble model* prikazuje konformacijsku složenost proteina.

Molekulski *docking* je kompjuterska metoda koja za cilj ima predviđanje optimalne orijentacije proteina prilikom vezivanja liganda za ciljno mjesto dejstva kao i konformacije interagujućih molekula u prostoru, uz procjenu stabilnosti nastalog kompleksa.

Molekulski *docking* se izvodi "vezivanjem" liganda u različitim položajima, odnosno prostornim orijentacijama, za različite regione u ciljnom molekulu, pri čemu se traži najbolje molekulsko prepoznavanje sa ciljem da se dođe do geometrijske konformacije sa minimalnom energijom vezivanja.

U zavisnosti od toga da li se ligand i protein posmatraju kao fleksibilni (zauzimaju različite prostorne orijentacije (poze)) ili rigidni, što zavisi od postavke metode, može se govoriti o rigidnom ili fleksibilnom *docking*-u, sa tri moguća slučaja: rigidni ligand/rigidni receptor, fleksibilni ligand/rigidni receptor (najčešće zastupljen) i fleksibilni ligand/fleksibilni receptor [52, 53].

Sam proces izvođenja molekulskog *docking*-a se sastoji iz više koraka koji podrazumijevaju: pripremu 3-D strukture ciljnog mjesta dejstva (npr. ciljnog proteina), pripremu liganda, procjenu energije vezivanja protein-ligand kompleksa i analizu rezultata.

Kompjuterski programi koji se najčešće koriste za molekulski *docking* su: *Glide*, *Dock*, *AutoDock*, *AutoDock Vina*, *GOLD*, *Surflex*, *FlexX*. [54].

Molekulski *docking* ima veliki značaj u dizajniranju novih lijekova i rutinski se uspješno primjenjuje posljednjih decenija. Za brzu pretragu velikih baza podataka u cilju pronalaženja *lead* jedinjenja koji će se vjerovatno vezivati za ciljno mjesto dejstva koristi se *virtual screening*. Optimizacija *lead* jedinjenja na osnovu informacija dobijenih putem *virtual screening*-a predstavlja često korišćeni metod u dizajniranju potentnijih i selektivnijih jedinjenja [55].

1.3.1. Komponente *docking* programa

Docking programi se sastoje od dvije osnovne komponente:

- algoritma za pretragu, koji učestvuje u generisanju pretpostavljene orijentacije/konformacije liganda (poze) koja će se vezati za ciljno mjesto dejstva (ova komponenta se dalje može podijeliti na dva dijela: uzorkovanje liganda i fleksibilnost proteina) i
- funkcije za bodovanje, koja služi za procjenu kvaliteta *dock*-ovanih kompleksa (računa skor ili afinitet vezivanja za pojedinačnu pozu što odražava jačinu vezivanja) [56].

Broj stepena slobode u rigidnom *docking*-u je šest, u fleksibilnom *docking*-u taj broj se povećava. Veći broj stepena slobode ima za posljedicu povećanje broja potrebnih kompjuterskih proračuna zbog čega se primenjuju algoritmi za uzorkovanje liganda (osnovni element protein-ligand *docking*-a). Uzimajući u obzir proteinsku strukturu ciljnog mjesta, algoritam uzorkovanja stvara potentne orijentacije / konformacije liganda (poze) oko izabranog mjesta vezivanja proteina. Postoje tri vrste algoritama za uzorkovanje liganda: *shape matching*, sistematska pretraga i stohastički algoritmi, kao i algoritmi koji predstavljaju kombinacije navedenih algoritama [57].

1.3.1.1. *Shape matching*

Shape matching metoda je zasnovana na jednom od najjednostavnijih algoritama za uzorkovanje. Često se koristi u ranim fazama *docking*-a i kao prvi korak u naprednim metodama uzorkovanja liganda. Metoda postavlja ligand u ciljno mjesto po kriterijumu koji podrazumijeva da molekulska površina postavljenog liganda mora ispuniti molekulsku površinu vezujućeg mjesta na proteinu. Šest stepena slobode (tri translatorna i tri rotacijska) liganda omogućavaju veliki broj potencijalnih orijentacija liganda u vezivnom mjestu. *Shape matching* algoritam ima za cilj da brzo pozicionira ligand u vezujuće mjesto sa dobrom komplementarnošću oblika. Primjeri *docking* programa koji koriste *shape matching* metodu su: *DOCK*, *FRED*, *FLOG*, *EUDOC*, *LigandFit*, *MS-DOCK* i *MDock*. Prednost *shape matching* metode je kompjuterska efikasnost, međutim, konformacija liganda se obično fiksira tokom procesa *shape matching*-a što je jedan od njegovih nedostataka [56].

1.3.1.2. Sistematsko pretraživanje

Sistematski algoritmi za pretragu se koriste kod fleksibilnog ligand *docking*-a, pri čemu oni vrše pretragu svih mogućih vezivnih konformacija liganda uzimajući u obzir sve stepene sloboda. Postoje tri vrste sistematskih metoda pretraživanja: iscrpna pretraga, fragmentacija i *conformation ensemble*.

Kod iscrpnih metoda pretraživanja vrši se sistematsko istraživanje vrijednosti svakog od stepena sloboda rotiranjem svih mogućih rotirajućih veza liganda. Sa povećanjem broja rotirajućih veza, povećava se i broj kombinacija što usložnjava cjelokupan proces. Kako bi se proces *docking*-a praktično mogao primijeniti, geometrijska / hemijska ograničenja se obično primjenjuju na inicijalnoj (*screening*) konformaciji liganda, a filtrirane konformacije

liganda nadalje podliježu preciznijim procedurama optimizacije. *Glide*, *eHiTS* i *FRED* su tipični primjeri programa sa iscrpnim metodama pretraživanja [56].

Fragmentacione metode se zasnivaju na dijeljenju liganda na manje fragmente pri čemu se određuje osnovni fragment koji se *dock*-uje u vezivnom mjestu receptora, a zatim se ligand rekonstituiše kovalentnim povezivanjem ostalih djelova molekula. Ove metode se najčešće koriste pri *de novo* dizajnu liganda. *DOCK*, *LUDI*, *FlexXs*, *ADAM* i *eHiTs* su primjeri *docking* programa koji koriste metode fragmentacije [58, 59].

Metode konformacionog skupa (engl. *conformation ensemble*) podrazumijevaju rigidni *docking* prethodno generisanih setova konformacija liganda pomoću drugih programa kao što je *OMEGA* (*OpenEye Scientific Inc.*, *NM*). Primjeri metode konformacionog skupa za *docking* uključuju: *FLOG*, *DOCK3.5*, *PhDOCK*, *MS-DOCK*, *MDock* i *K-Dock* [60].

1.3.1.3. Stohastički algoritmi

Stohastički algoritmi nasumično mijenjaju sve stepene slobode liganda (konformacijski i translaciono / rotacijski prostor liganda) u svakom koraku. Nasumična promjena će biti prihvaćena ili odbačena u skladu sa probabilističkim kriterijumom. Postoje četiri tipa stohastičkih algoritama: Metod *Monte Carlo* (MC), evolucionini algoritmi (EA), *Tabu* metode pretraživanja i *Swarm Optimization* (SO) metod.

U metodi *Monte Carlo*, vjerovatnoća prihvatanja nasumične promjene izračunava se korišćenjem sljedeće Boltzman-ove jednačine vjerovatnoće (1):

$$P \sim \exp \left[\frac{-(E_1 - E_0)}{k_B T} \right] \quad (1)$$

gdje E_0 i E_1 predstavljaju energetske rezultate liganda prije i poslije nasumične promjene, k_B je Boltzman-ova konstanta, a T je apsolutna temperatura sistema. *Docking* programi koji koriste MC metode uključuju: *DockVision*, *ICM*, *QXP*, *Prodock* i *MCDOCK* [56].

Evolucionini algoritmi (EA) traže pravilan oblik vezivanja liganda i zasnivaju se na Darwinovoj teoriji evolucije. Potencijalna rješenja problema koji se optimizuje predstavljaju populaciju jedinki koja evoluirala kroz generacije, uz veću vjerovatnoću opstanka onih jedinki koje su prilagođenije, odnosno onih rješenja koja su bolja. Najpopularniji tip EA je genetski algoritam (GAs). *GOLD*, *AutoDock*, *DIVALI*, *DARWIN*, *MolDock*, *PSI-DOCK*, *FLIPDock*, *Lead finder* i *EADock* su primjeri programa koji su implementirali evolucione algoritme [61, 62].

U *Tabu* metodama pretraživanja, vjerovatnoća prihvatanja zavisi od prethodno istraženih oblasti u konformacionom prostoru liganda. Nasumična promjena će biti odbijena ako je RMSD između trenutne konformacije vezivanja liganda i bilo kojeg prethodno zabilježenog rješenja manja od granične vrijednosti; u suprotnom, nasumična promjena će biti prihvaćena. Primjeri *docking* programa sa *Tabu* metodom pretraživanja su *PRO LEADS* i *PSI-DOCK* [57].

Swarm Optimization (SO) algoritmi se zasnivaju na logici ponašanja jata ptica, odnosno rojeva insekata – otuda i potiče njihov naziv. Ovi algoritmi pokušavaju da pronađu optimalno

rješenje pomoću informacija o najboljim pozicijama susjeda. Primjeri *docking* programa koji koriste SO algoritme uključuju: *SODOCK*, *Tribe-PSO*, *PSO @ Autodock* i *PLANTS* [60].

1.3.2. Fleksibilnost proteina

Vezivanje liganda često indukuje konformacijske promjene proteina (koje se nazivaju "indukovano fitovanje"), koje se kreću od lokalnih preuređivanja bočnih lanca do pomjeranja velikih domena. Zbog veličine i mnogobrojnih stepena slobode proteina, njihova fleksibilnost može biti jedno od najizazovnijih pitanja u molekulskom *docking*-u. Razvijene su različite metode koje razmatraju fleksibilnost proteina a mogu se grupisati u četiri kategorije: *soft docking*, fleksibilnost bočnih lanaca, molekulska relaksacija i *protein ensemble docking* [63, 64].

1.3.2.1. *Soft docking*

Soft docking je najjednostavniji metod koji implicitno razmatra fleksibilnost proteina, tako što dopušta mali stepen preklapanja između atoma liganda i proteina kroz slabljenje interatomskih van der Waals-ovih interakcija u proračunima *docking*-a. Prednosti *soft docking*-a su njegova efikasnost, lakoća implementacije i brzina izvođenja. Međutim, *soft docking* može računati samo male konformacijske promjene [65].

1.3.2.2. Fleksibilnost bočnih lanaca

Metoda fleksibilnosti bočnih lanaca može biti primijenjena u slučajevima kada efekti indukovanog fitovanja prevazilaze limite *soft docking*-a (osnovni niz ostaje fiksiran). Jedan od najranijih *protein docking* algoritama ovog tipa je razvio *Leach*, koji je uključio diskretnu fleksibilnost bočnih lanaca liganda koristeći biblioteke rotamera [65].

1.3.2.3. Molekulska relaksacija

Primjenom *rigid-body docking*-a uzima se u obzir fleksibilnost bočnih lanaca, ali i fleksibilnost osnovnog niza. Ligand se postavlja u vezivno mjesto, a zatim se atomi osnovnog niza i atomi bočnih lanaca koji se nalaze u blizini *opuštaju*. Kako bi se pratila fleksibilnost proteina tokom *docking*-a koriste se *Monte Carlo* (MC) i metoda molekulske dinamičke simulacije. Prednost metode molekulske relaksacije je dodatno uključivanje fleksibilnosti osnovnog niza uz konformacijske promjene bočnih lanaca, ali u poređenju sa metodom fleksibilnosti bočnih lanaca, zahtjevnija je za funkciju bodovanja što može dovesti do netačnih rezultata (npr. neadekvatne torzije osnovnog niza) u opuštenim konformacijama proteina [66].

1.3.2.4. *Ensemble docking* (*Docking* multiplih proteinskih struktura)

Ensemble docking razmatra fleksibilnost proteina na setu proteinskih konformacija umjesto na jednoj konformaciji. Metoda se zasniva na prosječnoj energetskoj mreži koja je

konstruisana na osnovu kombinovanja energetskih mreža generisanih od pojedinačnih eksperimentalno određenih proteinskih struktura uz pomoć sheme ponderisanja. Oko prednosti koju *ensemble docking* nudi stavovi su podijeljeni. Neke studije pokazuju da poboljšana tačnost *docking*-a koja je dobijena korišćenjem ove metode nije opšte prirode, jer se u određenim slučajevima postižu čak i lošiji rezultati. Uprkos tome, korištenjem navedene metode postignuto je značajno poboljšanje u preciznosti *docking*-a [56].

1.3.3. Funkcije bodovanja

Funkcija bodovanja je ključni element protein-ligand *docking* algoritma. Funkcija bodovanja vrši procjenu kvaliteta *dock*-ovanih poza, usmjeravajući pretragu ka najpoželjnijim konformacijama liganda. Osnovni ciljevi funkcije bodovanja podrazumijevaju:

- sposobnost razlikovanja eksperimentalno uočenih načina vezivanja - povezujući ih sa najnižim energetskim vrijednostima iz svih drugih poza koje istražuje algoritam za pretragu (predviđanje poze);
- klasifikacija aktivnih i neaktivnih liganda (*virtual screening*);
- predviđanje konstanti afiniteta i ispravno rangiranje jedinjenja u skladu sa njihovom potencijom (procjena afiniteta vezivanja).

Dva važna aspekta funkcije bodovanja su brzina i tačnost. U proteklih nekoliko decenija razvijene su brojne funkcije bodovanja i prema metodama izvođenja mogu se grupisati u tri osnovne kategorije: *force field*, empirijske i *knowledge-based* funkcije bodovanja [60].

1.3.3.1. *Force field* funkcije bodovanja

Force field funkcije bodovanja (FF) se zasnivaju na dekompoziciji energije vezivanja liganda na pojedinačne interakcije, kao što su van der Waals-ova (VDW) energija, elektrostatička energija, energija rastezanja / savijanja / torziona energija veze itd., koristeći skup izvedenih *force field* parametara kao što su *AMBER* ili *CHARMM*. Ovaj tip funkcije bodovanja razmatra energije interakcija protein-ligand kompleksa i internu energiju liganda.

Jedan od glavnih izazova u FF funkciji bodovanja je način na koji se računa efekat rastvarača (rastvarač nije eksplicitno uzet u obzir, a time ni procjena energije desolvatacije) kao i efekat entropije [67].

1.3.3.2. Funkcije empirijskog bodovanja

U empirijskim funkcijama bodovanja, vrijednost energije vezivanja kompleksa izračunava se sabiranjem skupa ponderisanih empirijskih energija (VDW energija, elektrostatička energija, energija vodoničnih veza, energija desolvatacije, entropija, hidrofobnost itd.) prema jednačini (2):

$$\Delta G = \sum_i W_i \cdot \Delta G_i \quad (2)$$

gdje ΔG_i predstavlja skup pojedinačnih empirijskih energija, a odgovarajući koeficijenti W_i se određuju reprodukcijom podataka o afinitetu vezivanja trening skupa protein-ligand kompleksa sa poznatim trodimenzionalnim strukturama, koristeći fitovanje najmanjih kvadrata. U poređenju sa *force field* funkcijama, empirijske funkcije bodovanja su računski efikasne zbog jednostavnih energetskih uslova. Opšta primjenljivost empirijske funkcije bodovanja zavisi od trening seta. Porastom broja kristalnih struktura različitih protein-ligand kompleksa sa poznatim afinitetima vezivanja i korištenjem istih za formiranje trening setova, može se razviti opšta empirijska funkcija bodovanja. *GlideScore*, *PLP*, *SIBIL / F-Score*, *LigScore*, *LUDI*, *SCORE*, *Ks-Score*, *ChemScore*, *MedusaScore*, *AIScore* i *SFCscore* su primjeri empirijskih funkcija bodovanja [56].

1.3.3.3. *Knowledge-based* funkcije bodovanja

Potencijalni parametri *knowledge-based* funkcije bodovanja direktno su izvedeni iz strukturnih informacija u eksperimentalno određenim protein-ligand kompleksima. Princip *knowledge-based* funkcija bodovanja je potencijal srednje sile, koji je određen inverznim Boltzmanovim odnosom – prikazano jednačinom (3):

$$w(r) = -k_B T \ln[\rho(r)/\rho^*(r)] \quad (3)$$

gdje je k_B Boltzman-ova konstanta, T je apsolutna temperatura sistema, $\rho(r)$ je gustina para atoma protein-liganda na rastojanju r u trening setu, a $\rho^*(r)$ je gustina u referentnom stanju gdje su interatomske interakcije nula. Nakon izvedenih potencijalnih parametara $w(r)$, energija vezivanja liganda za dati kompleks je jednostavno zbir interakcija za sve komplekse proteina i liganda u parovima. Na osnovu rane ideje Tanake i Scheraga, razvijen je niz *knowledge-based* funkcija bodovanja za protein-ligand interakcije. U poređenju sa *force field* i funkcijama empirijskog bodovanja, *knowledge-based* funkcije nude dobar balans između tačnosti i brzine. Kako za komplikovane sisteme poput proteina idealno referentno stanje nije dostupno, novi izazov za *knowledge-based* funkcije je izračunavanje pomenutog referentnog stanja [56].

1.3.4. *AutoDock Vina*

AutoDock Vina (u daljem tekstu *Vina*) je program za molekularni *docking* i *virtual screening* koji je razvijen od strane dr Oleg Trott-a iz *Molecular Graphics Lab, The Scripps Research Institute*.

Funkcija bodovanja *Vine* kombinuje određene prednosti *knowledge-based* i empirijskih funkcija bodovanja: ekstrahuje empirijske informacije iz konformacijskih preferenci receptor-ligand kompleksa, kao i iz eksperimentalnih mjerenja afiniteta vezivanja.

U razvoju *Vine* korišćeni su raznovrsni stohastički pristupi optimizacije, uključujući genetske algoritme, *swarm* optimizaciju i sl, pri čemu su korišćene i različite procedure lokalne optimizacije. U osnovi programa *Vina* nalazi se *Iterated Local Search global optimizer* algoritam u kome se pokreće niz koraka koji se sastoje od mutacije i lokalne optimizacije,

pri čemu se svaki korak prihvata prema Metropolisovom kriterijumu. Za lokalnu optimizaciju koristi se *Broiden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (BFGS) metod.

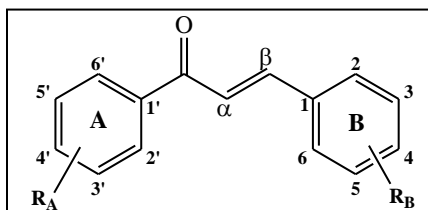
BFGS, kao i druge kvazi-*Newton* metode optimizacije koristi ne samo vrijednost funkcije bodovanja, već i njen gradijent.

Vinu karakteriše tačnost, preciznost, jednostavnost korišćenja i brzina. Primjenom *multithreadinga*, ovaj program može dodatno ubrzati obavljanje funkcija koristeći više CPU. Program je dizajniran tako da bude kompatibilan sa formatima fajlova koji se koriste za *AutoDock*, kao što je npr. PDBQT. Ovo umnogome olakšava upotrebu *Vine* jer se za pripremu datoteka, izbor prostora za pretraživanje i pregled rezultata mogu koristiti postojeći pomoćni programi razvijeni za *AutoDock*, kao što je npr. *AutoDock Tools* [68, 69].

1.4. Halkoni

Halkoni su propiofenonski derivati rasprostranjeni u biljnom svijetu (u povrću, ljekovitom bilju), gdje nastaju kao intermedijeri u sintezi flavonoida, dejstvom enzima halkon-sintaze. Danas se uglavnom dobijaju polu- ili totalnom sintezom, reakcijom aldolne kondenzacije (*Claisen-Schmidt*-ova reakcija). Naziv „halkoni“ vodi porijeklo od grčke riječi „*chalcos*“, što znači „bronzna“ i ukazuje na najčešću boju većine prirodnih halkona.

Po strukturi, halkoni su α , β -nezasićeni ketoni, derivati 1,3-diaril-2-propen-1-ona (Slika 12). Postoje kao *cis* i *trans* izomeri, pri čemu je *trans* izomer termodinamički stabilniji. *Cis* izomer je nestabilan zbog jakog sternog efekta između karbonilne grupe i aromatičnog prstena [6].



Slika 12. Opšta strukturalna formula halkona

Prisusvo α , β -nezasićenog karbonilnog sistema čini halkone reaktivnim kako *in vitro* tako i *in vivo*. Halkoni pokazuju različite biološke aktivnosti: antiinflamatornu [7], antioksidativnu [70], antimikrobnu [9, 10, 12], antiproliferativnu [11]. Međutim, enonska grupa je sposobna da formira ireverzibilne veze sa biološkim makromolekulima, što rezultira nizom neželjenih efekata (alergijske reakcije, kancerogenost i mutagenost). Zbog niske selektivnosti, halkoni imaju ograničenu kliničku primjenu. U terapiji se koristi nekoliko jedinjenja koja su strukturalno halkoni. Metohalkon je registrovan kao holeretski lijek [7], a sofalkon kao antiulcerski lijek koji povećava količinu prostaglandina mukoze, pružajući gastroprotektivni efekat u borbi protiv *Helicobacter pylori* [6]. Na reaktivnost α , β -nezasićenog karbonilnog sistema halkona utiče supstitucija na aromatičnim prstenovima što je od značaja za dizajn i sintezu novih strukturalnih analoga halkona kao potencijalnih lijekova koji bi našli primjenu u kliničkoj praksi [71, 72].

1.4.1. Anti-HIV-1 proteazna aktivnost halkona

Postoje studije koje pokazuju da halkoni imaju antivirusnu aktivnost protiv nekoliko virusa. U jednoj studiji, supstituisani halkoni, u poređenju sa flavonoidima, pokazali su inhibiciju virusne translacije bez značajnog uticaja na replikaciju virusa u ćelijama inficiranim virusom hepatitisa C (HCV) [73]. Druga studija je pokazala da derivati 4-tiohinazolina koji sadrže halkonsku grupu imaju značajnu aktivnost protiv *tobacco mosaic* virusa (TMV) [74]. Kardamonin je pokazao značajnu anti-HIV-1 proteaznu aktivnost (75,1% inhibicije) sa IC_{50} vrijednošću od 31 g / ml [75]. Halkon izolovan iz roda *Desmos* pokazao je snažnu anti-HIV aktivnost ($EC_{50} = 0,022$ g / mL) sa dobrim terapijskim indeksom. Ispitivanja su pokazala da je za anti-HIV aktivnost potencijalno kritična metoksi grupa koja se nalazi u *para* položaju osnovne strukture halkona [76].

1.5. Lipofilnost

Lipofilnost predstavlja fizičko-hemijsku osobinu od izuzetnog značaja u farmaceutskoj hemiji. Za supstance koje su kandidati za novi lijek, vrlo je važno tokom rane faze razvoja odrediti vrijednosti ovog parametra. Na osnovu lipofilnosti moguće je predvidjeti bioraspoloživost ispitivane supstance tj. njenu apsorpciju, distribuciju, metabolizam, eliminaciju i toksičnost (ADMET) [77].

Najveći broj ćelijskih membrana u organizmu se sastoji od dvostrukog lipoproteinskog sloja, stoga lipofilnost molekula predstavlja ograničavajući faktor za prolazak kroz membrane. Takođe, lipofilnost značajno određuje ligand-receptor interakcije i druge ligand-makromolekul interakcije (npr. enzim-supstrat i antigen-antitijelo interakcije, vezivanje neurotransmitera, hormona i lijekova za receptore itd.).

Veoma lipofilni molekuli imaju slabu rastvorljivost. Zbog visokog afiniteta prema lipidima brzo prolaze kroz ćelijske membrane i uspostavljaju slabe interakcije sa receptorima. Veoma lipofilni molekuli se dominantno metabolišu u jetri, dok se manje lipofilni molekuli eliminišu putem urina. Visok afinitet ka lipidima može usloviti formiranje farmakološki neaktivnih kompleksa usljed akumulacije lijeka u masnom tkivu (što može dovesti do neželjenih, tj. toksičnih efekata primijenjenog lijeka) [78, 79].

Na postojanje veze između rastvorljivosti u lipidima i biološke aktivnosti jedinjenja ukazali su još početkom 20. vijeka Meyer i Overton, koji su prvi koristili ulje/voda particione koeficijente u svojim ispitivanjima. Hansch, Fujita i Leo su zaslužni za sprovođenje prvih sistematskih ispitivanja lipofilnosti, uvodeći oktanol/voda sistem kao referentni za formiranje empirijske skale za navedenu fizičko-hemijsku osobinu, kako bi ista mogla biti korištena u razvoju novih lijekova [77].

1.5.1. Parametri lipofilnosti

Lipofilnost se izražava preko koeficijenta raspodjele P (particioni koeficijent) i predstavlja odnos koncentracije neutralnog oblika jedinjenja u lipofilnoj i vodenoj fazi. Zbog velikog opsega vrijednosti partitionog koeficijenta, a da bi se vrijednosti lakše poredile, koriste se logaritamske vrijednosti, odnosno $\text{Log}P$ (jednačina 4):

$$\text{Log } P = \text{Log} \frac{C_o}{C_w} \quad (4)$$

C_o predstavlja koncentraciju jedinjenja u nepolarnom organskom rastvaraču, npr. n-oktanolu, a C_w koncentraciju jedinjenja u vodenoj fazi.

Ukoliko je $\text{Log}P = 0$, jedinjenje će se podjednako raspoređivati između lipofilne i hidrofilne faze. Ukoliko je $\text{Log}P = 1$, jedinjenje će imati 10 puta veći afinitet za lipofilnu fazu, a ukoliko je vrijednost $\text{Log}P = -1$, afinitet jedinjenja za hidrofilnu fazu je 10 puta veći. Jedinjenja čija je vrijednost $\text{Log}P$ veća od 5 (100 000 puta veći afinitet za lipofilnu fazu), smatraju se toksičnim, jer će se usljed velike lipofilnosti deponovati u masnom tkivu.

Na vrijednost $\text{Log}P$ utiče nekoliko osnovnih strukturnih osobina jedinjenja:

- molekularna zapremina;
- dipolarnost;
- donori vodonične veze;
- akseptori vodonične veze.

Molekularna zapremina je povezana sa molekulskom masom, povećava se kako molekulska masa raste i utiče na veličinu šupljine koja se mora formirati u rastvaraču da bi se solubilizovao molekul. Dipolarnost utiče na polarno poravnavanje molekula sa rastvaračem, a samim tim i na njegovu dipol-dipol interakciju.

Ako jedinjenje ostvaruje interakcije sa jednom od faza (jonizacija, agregacija, formiranje jonskih parova) za definisanje lipofilnosti tog jedinjenja koristi se pogodniji parametar-efektivni koeficijent raspodjele D . Ovaj koeficijent predstavlja odnos koncentracija jonizovanog i nejonizovanog oblika jedinjenja u lipofilnoj i vodenoj fazi, odnosno definiše lipofilnost pri određenoj vrijednosti pH . Analogno $\text{Log}P$, za jednostavnije poređenje efektivnih koeficijenta raspodjele koristi se $\text{Log}D$ [80].

Za monoprotonske kiseline i baze, $\text{Log}D$ se može predvidjeti za svaku pH vrijednost ukoliko je poznata lipofilnost neutralnog oblika ($\text{Log}P$) i pK_a vrijednost, pomoću Henderson-Hasselbach jednačine (5):

$$\log D \cong \log P + \log \left[\frac{1}{(1 + 10^{|\text{pH} - \text{pK}_a|})} \right] \quad (5)$$

1.5.2. Određivanje parametara lipofilnosti

Parametri lipofilnosti se mogu odrediti eksperimentalno ili se mogu izračunati pomoću različitih računarskih programa. Eksperimentalne metode određivanja mogu biti direktne i indirektne.

Iako eksperimentalno određivanje lipofilnosti izgleda jednostavno i lagano, eksperimentalni uslovi mogu u velikoj mjeri uticati na dobijene vrijednosti. Particioni rastvarači, pH , jonska jačina, temperatura, sastav pufera, ko-rastvarači, samo su neki od uslova koji moraju biti pažljivo kontrolisani prilikom određivanja lipofilnosti jer dobijeni podaci mogu značajno da se razlikuju pri različitim uslovima [81].

Postoji više *in vitro* metoda koje se koriste za određivanje lipofilnosti: *shake flask* metoda, hromatografske metode, kapilarna elektroforeza i pH -metrijska metoda.

1.5.2.1. *Shake flask* metoda

Klasična metoda za direktno određivanje lipofilnosti je *shake flask* metoda. Izvodi se tako što se određena količina ispitivane supstance mučka u sistemu dva rastvarača, koji se slabo miješaju. Po uspostavljanju dinamičke ravnoteže, kada se slojevi razdvoje, u svakoj od faza se odredi koncentracija ispitivane supstance. Kao lipofilna faza se najčešće koristi n -oktanol, dok se kao hidrofilna faza koristi voda, mada se mogu koristiti i drugi rastvarači. n -oktanol se najčešće koristi zbog svoje strukture, koju čini osam hidrofobnih ugljenikovih atoma i

jedna hidrofилна primarna alkoholna grupa, a koja najbolje simulira većinu bioloških membrana. Hidroksilna funkcionalna grupa n-oktanol pripada grupi amfiprotinskih rastvarača, jer u vodoničnoj vezi može da bude i donor i akceptor elektrona, kao i polarne grupe većine bioloških membrana. Tačnije, sistem oktanol/voda je od značaja za formiranje modela za simuliranje vezivanja za proteine seruma kao i formiranje modela za lipofilne interakcije sa biološkim membranama. Za druge tipove bioloških membrana primjenljiviji su drugi rastvarači. Za membrane koje nemaju ni proton-donorske ni proton-akceptorske osobine, modelovanje se vrši inertnim rastvaračima (alkani/voda). Kada membrane u svojoj strukturi sadrže proton-donorske funkcionalne grupe, kao lipofilna faza se koristi hloroform, a kada su u membrani dominantne proton-akceptorske funkcionalne grupe (fosfolipidna membrana) kao lipofilna faza se koristi smješa propilen-glikol-dipelargonat (PGDP). *Shake flask* metoda ima nedostatke kao što su: slaba reproduktivnost, dugo vrijeme izvođenja eksperimenta, nemogućnost primjene na visoko lipofilna ili visoko hidrofилna jedinjenja, problem stvaranja emulzija. [82].

1.5.2.2. Hromatografske metode

Shake flask metoda se zbog svojih nedostataka često zamjenjuje drugim eksperimentalnim metodama, i to u prvom redu hromatografskim metodama kao što su reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (engl. *reversed phase thin layer chromatography* - RP-TLC) i reverzno-fazna visoko-efikasna tečna hromatografija (engl. *reversed phase high-performance liquid chromatography* - RP-HPLC) [83].

1.5.2.2.1. Reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (RP-TLC)

Jedna od metoda izbora za određivanje parametara retencije je tankoslojna hromatografija. Glavne prednosti tankoslojne hromatografije su: jednostavnost, ekonomičnost, brzina, širok izbor stacionarnih faza, mogućnost ispitivanja nekoliko uzoraka istovremeno čime se smanjuje vrijeme i troškovi analize, uz upotrebu male količine mobilne faze i jednostavnu pripremu uzorka. Dodatno, prednosti TLC tehnike u odnosu na metodu mućkanja se ogledaju i u tome što ispitivana jedinjenja ne moraju da budu čista, a neophodna je samo mala količina supstance.

Reverzno-fazna tankoslojna hromatografija se smatra opšte prihvaćenom metodom za određivanje lipofilnosti jedinjenja [84]. Retencioni faktor (R_f vrijednost) dobijen primjenom RP-TLC može da se dovede u vezu sa particionim koeficijentom P , što su 1941. godine pokazali Martin i Syngle [85]. Na retenciju jedinjenja u hromatografiji u najvećoj mjeri utiču procesi adsorpcije i particije. Primjenom hromatografskih tehnika moguće je odrediti deskriptore lipofilnosti koji utiču na retenciju. Zamjena uobičajene hidrofилne stacionarne faze hidrofobnom stacionarnom fazom, omogućila je eksperimentalno određivanje lipofilnih osobina jedinjenja reverzno-faznom hromatografijom.

Kako bi se definisala linearna zavisnost između hemijske strukture jedinjenja i ponašanja u hromatografskom sistemu uvedena je R_M vrijednost [86]. R_M vrijednost je jednaka logaritmu odnosa rastojanja između fronta rastvarača i zone supstance, i puta koji je prešla ispitivana supstanca. R_M vrijednost će biti veća kod manje polarnih supstanci koje jače interaguju sa

stacionarnom fazom, što za posljedicu ima i sniženje R_f vrijednosti. Stoga kod hromatografskog sistema u kojem dominira particioni mehanizam, R_M vrijednosti su u direktnoj korelaciji sa lipofilnošću jedinjenja.

R_M^0 vrijednost su definisali Biagi i saradnici kao R_M vrijednost ekstrapolisane na nula koncentraciju organske komponente, tj. na čistu vodu. Obje vrijednosti se mogu koristiti kao mjera lipofilnosti jedinjenja [87].

Parametar C_0 se takođe može koristiti kao deskriptor lipofilnosti. Ovaj parametar opisuje koncentraciju organskog modifikatora u mobilnoj fazi za koju je raspodjela supstance između dvije faze jednaka, odnosno $R_f = 0,5$, a $R_M = 0$ [88].

Kod RP-TLC metode kao stacionarna faza najčešće se koristi silikagel RP-18, dok se kao mobilna faza koristi smješa vode (ili pufera) i organskog rastvarača (tzv. modifikator) u različitim odnosima. Najčešće upotrebljavani organski modifikatori su metanol, aceton i acetonitril, a dioksan i tetrahidrofuran se rjeđe upotrebljavaju [89].

1.5.2.2. Reverzno-fazna visoko-efikasna tečna hromatografija (RP-HPLC)

Hromatografija sa reverznim fazama predstavlja najbrži i jednostavan način da se eksperimentalno odredi $\text{Log}P$, s obzirom na činjenicu da ne zahtijeva kvantitativna određivanja. U RP-HPLC metodi, indeksi lipofilnosti su izvedeni iz retencionog faktora $\text{Log}k$, koji se izračunava pomoću sljedeće jednačine (6):

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (6)$$

gdje su t_r i t_0 retencionna vremena ispitivane supstance i mobilne faze.

Da bi se eliminisali efekti organskih rastvarača oba retencionna parametra ($\text{Log}k_w$ i R_M^0), se dobijaju ekstrapolacijom. S obzirom na to da se retencija određuje u dvokomponentnoj pokretnoj fazi koja može biti različitog sastava, ekstrapolacija je uobičajeni postupak standardizacije hromatografskih parametara. $\text{Log}k_w$ predstavlja retenciju supstance u čistoj vodi čime se uticaj organskog rastvarača svodi na minimum. Uopšteno, ekstrapolacija u odnosu na 100% vodu se zasniva na odnosu između retencionog faktora $\text{Log}k$ i zapreminskog udjela organskog rastvarača u mobilnoj fazi, ϕ (jednačina 7):

$$\log k = -S\phi + \log k_w \quad (7)$$

gde je S nagib a $\text{Log}k_w$ odsječak regresione krive.

Za veliki broj jedinjenja koja nisu strukturno slična uspostavljena je značajna korelacija između indeksa $\text{Log}k_w$ i $\text{Log}P$ dobijenog tradicionalnom *shake flask* metodom. Pokazano je da postoji linearna zavisnost između $\text{Log}P$ i $\text{Log}k_w$, pa je moguće konstruisati grafik za jedinjenja čije su $\text{Log}P$ vrijednosti poznate i ekstrapolacijom očitati $\text{Log}P$ za analizirana jedinjenja.

Kod RP-HPLC metode se kao stacionarna faza najčešće koristi modifikovani silikagel (RP-18), a kao mobilna faza smješa vode (ili pufera) i organskog rastvarača (organskog modifikatora) kao što su metanol, acetonitril [83].

1.5.2.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza se zasniva na mikroemulzijsko elektrokinetičkoj hromatografiji ili micelarno elektrokinetičkoj hromatografiji. Micelarna/mikroemulziona elektrokinetička hromatografija je poboljšana hromatografska metoda koja koristi različite površinski aktivne supstance u koncentracijama koje su u oblasti njihove kritične micelarne koncentracije. Ovi sistemi su se pokazali kao pogodni za brzo određivanje $\text{Log}P$ neutralnih molekula. Međutim, kod molekula koji disociraju ni ova metoda ne daje tačne $\text{Log}P$ vrijednosti [90].

Bez obzira na veoma dobre korelacije između hromatografskih retencionih parametara i $\text{Log}P$, koje su dobijene u radovima, jasno je da hromatografski procesi ne mogu zamijeniti klasični pristup određivanja $\text{Log}P$ vrijednosti. Ovo posebno postaje jasno kada se ima u vidu da u hromatografiji eventualna ravnoteža između dvije faze povlači sa sobom različite međumolekulske interakcije: rastvorena supstanca-stacionarna faza, rastvorena supstanca-mobilna faza, mobilna faza-stacionarna faza, mobilna faza-mobilna faza i međusobne interakcije fleksibilnih fragmenata stacionarne faze [91].

1.5.2.4. pH-metrijska metoda

Za određivanje lipofilnosti može se koristiti modifikovana titrimetrijska metoda za određivanje pK_a .

pH-metrijska metoda se izvodi tako što se ispitivano jedinjenje prvo titrira dodavanjem poznatog ekvivalenta kiseline ili baze da bi se dobila kriva titracije. Potom se dodaje n -oktanol i dvokomponentna smješa ponovo titrira bazom ili kiselinom do početne pH vrijednosti. Ukoliko je ispitivana supstanca lipofilna, druga titraciona kriva će se razlikovati od prve. Iz svake titracione krive mogu se očitati dvije konstante: pK_a iz prve, i p_oK_a iz druge titracione krive. Ukoliko je razlika između vrijednosti ove dvije konstante velika, supstanca ima visoku vrijednost $\text{Log}P$ [81].

pH-metrijska metoda nije brza kao HPLC metoda, ali može poslužiti kao alternativa metodi mućkanja za ispitivanje jonizovanih molekula (molekul mora biti jonizovan i imati pK_a u odgovarajućem pH-opsegu).

1.5.2.5. Metoda filter probe

Metoda filter probe je slična potenciometrijskoj metodi, s tim da se detekcija ispitivanih supstanci vrši spektroskopski. Metoda je vrlo brza i pouzdana, a nedostatak je što se ne može primijeniti kod molekula sa vrijednostima $\text{Log}P$ manjim od 0,2. Kritičan dio predstavlja određivanje izobastične tačke ispitivane supstance (talasne dužine pri kojima se apsorpcioni spektri sijeku) na UV spektru [92].

Nedavno, Chen i Weber (2007) su razvili metodu za mjerenje lipofilnosti koja se zasniva na raspodjeli jedinjenja između polimernih i vodenih faza ($\text{Log}P\text{-pw}$) [93].

1.5.3. Računarske metode za predviđanje parametara lipofilnosti

Pored eksperimentalnih metoda za određivanje $\text{Log}P$ često se koriste i računarske metode. Računarske metode za određivanje $\text{Log}P$ se dijele u dvije glavne grupe:

- metode zasnovane na podstrukturi, koje uzimaju u obzir doprinos pojedinačnih atoma (metode atoma) ili pojedinih fragmenata u molekulu (fragmentacione metode), uz primjenu korekcionih faktora usljed intramolekulskih interakcija;
- metode koje se zasnivaju na molekulskim osobinama (cjelomolekulski pristup) koji sagledava cijeli molekul koristeći se molekulskim lipofilnim potencijalom, topološkim indeksima ili molekulskim osobinama.

Računarske metode za izračunavanje $\text{Log}P$ imaju čitav niz prednosti:

- predviđanja su razumno pouzdana;
- softveri su brzi i dostupni (često je potrebno odrediti parametar lipofilnosti za veliki broj jedinjenja pri čemu računarske metode imaju prednost u odnosu na eksperimentalna određivanja);
- softveri pokrivaju širok dinamički raspon;
- mogućnost izračunavanja $\text{Log}P$ i za izrazito lipofilna jedinjenja;
- nema dodatnih troškova za izvođenje eksperimentalnih metoda za određivanje $\text{Log}P$ kao i svih problema koji se javljaju prilikom sprovođenja eksperimentalnih metoda (interferencije nečistoća, slaba rastvorljivost ili potreba za ko-rastvaračima).

Međutim, nedostatak ove metode je pojava greške kada se radi o molekulima složene strukture, čiji se pojedini fragmenti ne mogu naći u bazi podataka [81, 94].

1.5.4. Kvantitativna veza između strukture i retencije (engl. *Quantitative structure-retention relationship - QSRR*)

Procesi apsorpcije, distribucije i izlučivanja lijekova, kao i njihova interakcija sa receptorima su po svojoj prirodi dinamički procesi u čijoj osnovi je zastupljen proces raspodjele.

Martin A.J.P. je tokom 1950. godine nizom ispitivanja pokazao da na retenciju jedinjenja u dvofaznom sistemu utiču strukturne promjene u molekulu, kao i osobine mobilne i stacionarne faze što predstavlja začetak razvoja istraživanja kvantitativne veze između strukture i retencije (QSRR) [95].

Opšti cilj QSRR ispitivanja podrazumijeva predviđanje retencionog ponašanja jedinjenja na osnovu strukture molekula, kao i predviđanje fizičko-hemijskih parametara na osnovu retencionih podataka.

QSRR ispitivanja zahtijevaju dvije vrste ulaznih podataka: hromatografske podatke (retenciju), koji su zavisne promjenljive, i parametre koji se odnose na strukturne karakteristike ispitivanih jedinjenja, koji su nezavisne promjenljive. Ulazni podaci se pomoću kompjuterskih programa inkorporiraju u QSRR jednačinu.

Molekulske strukture za QSRR predstavljaju se pomoću molekulskih deskriptora, numeričkih vrijednosti kojima se mogu prikazati osobine odabranog molekula ili dijela molekula. Deskriptori koji opisuju molekulsku strukturu se dijele na: fizičko-hemijske, kvantno-hemijske, topološke itd. Prednost fizičko-hemijskih deskriptora je u tome što su oni uglavnom snažno povezani sa retencijom i koreliraju sa retencionim podacima. Međutim, oni

često nisu dostupni ili su dostupni sa relativno velikim greškama. Prednost kvantno-hemijskih deskriptora je što pružaju uvid u mehanizam hromatografske retencije na molekulskom nivou. Međutim, njihova povezanost je slaba, a izračunavanje je dugotrajno. Topološke deskriptore je lako izračunati pomoću postojećih računarskih programa, ali oni nisu nužno povezani sa retencionim fenomenima.

Ključno za izradu uspješnih QSRR modela je od velikog broja korelisanih deskriptora izdvojiti najinformativnije.

Značaj QSRR istraživanja u dizajniranju novih, potencijalnih lijekova se ogleda u činjenici da je odnos između retencionih podataka i fizičko-hemijskih parametara u vezi sa aktivnošću lijeka. S tim u vezi particioni koeficijent ($\text{Log}P$), napon pare, tačka ključanja, Gibbs-ova slobodna energija su samo neke od karakteristika molekula koje se mogu predvidjeti na osnovu definisane veze sa retencijom [96].

1.6. Redoks aktivnost

1.6.1. Oksidativni stres

Opšte je poznato da se mnoge bolesti razvijaju kao posljedica izmijenjenih fizioloških funkcija do čijih promjena dolazi pod uticajem različitih agenasa iz spoljašnje i unutrašnje sredine. U čovjekovom organizmu se stalno, tokom najrazličitijih reakcija, čak i normalnih fizioloških procesa, stvaraju izuzetno reaktivni oblici molekula – slobodni radikali, koji mogu ispoljiti i korisne i štetne efekte. Štetni efekti slobodnih radikala podrazumijevaju biološka oštećenja u uslovima oksidativnog stresa.

U biološkim sistemima postoji balans između produkcije i neutralizacije slobodnih radikala. Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa koji nastaje zbog prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu. Usljed prekomjernog stvaranja, slobodni radikali mogu dovesti do oštećenja, ali i smrti ćelije. Posljedica toga može biti razvoj neke od bolesti kao što su: ateroskleroza, karcinom, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, proces starenja i sl. Oksidativni stres je involviran i u patogenezu AIDS-a, s obzirom na to da se HIV replicira u visoko oksidovanom okruženju [15, 97].

1.6.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali predstavljaju atome ili molekule koji u svojoj strukturi u spoljašnjem elektronskom omotaču sadrže najmanje jedan nespareni elektron, što ih čini visoko reaktivnim, te mogu lako reagovati sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama kao i sa drugim biomolekulima. Često dolazi i do lančanih reakcija i pokretanja brojnih i nekontrolisanih složenih reakcija koje mogu dovesti do oštećenja ćelijskih struktura. Na taj način, ćelije brže stare i podliježu degenerativnim procesima.

Pored slobodnih radikala, pro-oksidativno djelovanje imaju i neradikalni oblici koji se ponašaju kao oksidansi i lako se prevode u radikale. U podjeli reaktivnih jedinjenja koju su sačinili Halliwell i Gutteridge postoje: reaktivna kiseonikova jedinjenja, reaktivna hlorova jedinjenja, reaktivna bromova jedinjenja i reaktivna azotna jedinjenja, od kojih svaka grupa obuhvata radikalna i neradikalna jedinjenja (Tabela 1) [70].

Tabela 1. Nomenklatura reaktivnih jedinjenja

Slobodni radikali	Neradikalni oblici
<i>Reaktivna kiseonikova jedinjenja (engl. Reactive oxygen species - ROS)</i>	
superoksid, $O_2^{\cdot-}$ hidroksi, OH^{\cdot} hidroperoksid, HO_2^{\cdot} peroksi, RO_2^{\cdot} alkoksi, RO^{\cdot} karbonat, $CO_3^{\cdot-}$ ugljendioksid, $CO_2^{\cdot-}$	vodonik peroksid, H_2O_2 hipobromna kiselina, $HOBr$ hipohlorna kiselina, $HOCl$ singletni kiseonik, 1O_2 organski peroksid, $ROOH$ peroksinitrit, $ONOO$ peroksinitritna kiselina, O_2NOOH

<i>Reaktivna hlorova jedinjenja (engl. Reactive chlorine species - RCS)</i>	
atomski hlor, Cl [•]	hipohlorna kiselina, HOCl nitril (nitronijum) hlorid, NO ₂ Cl hloramini gas hlor, Cl ₂
<i>Reaktivna bromova jedinjenja (engl. Reactive bromine species - RBS)</i>	
atomski brom, Br [•]	hipobromna kiselina, HOBr brom hlorid, BrCl gas brom, Br ₂
<i>Reaktivna azotna jedinjenja (engl. Reactive nitrogen species - RNS)</i>	
azotmonoksid, NO [•] azotdioksid, NO ₂ nitratni radikal, NO ₃ [•]	nitritna kiselina, HNO ₂ nitrozo katjon, NO ⁺ nitroksidni anjon, NO ⁻ dinitrogen tetroksid, N ₂ O ₄ dinitrogen trioksid, N ₂ O ₃ peroksinitrit, ONOO ⁻ peroksinitritna kiselina, ONOOH nitronijum (nitril) katjon, NO ₂ ⁺ alkilperoksinitriti, ROONO nitril (nitrinijum) hlorid, NO ₂ Cl

U nastavku je dat pregled najznačajnijih ROS:

- **Superoksidni radikal** (O₂^{•-}) predstavlja primarni ROS, koji u reakciji sa drugim molekulima daje sekundarne ROS. U ćelijama se najveća količina superoksidnog radikala produkuje u mitohondrijama redukcijom O₂. Enzim superoksid dizmutaza prevodi O₂^{•-} u vodonik peroksid (H₂O₂), a u kiseloj sredini, moguća je i spontana dismutacija O₂^{•-} u H₂O₂ [98, 99].
- **Vodonik peroksid** (H₂O₂) se u najvećoj mjeri produkuje u peroksizomima. Peroksizomi sadrže i enzim katalazu koja razlaže H₂O₂ do H₂O, čime se sprečava njegovo nakupljanje. Ukoliko dođe do oštećenja peroksizoma ili prekomjernog nakupljanja H₂O₂ usljed nishodne regulacije enzima koji ga troše, H₂O₂ se oslobađa u citosol gdje značajno doprinosi razvoju oksidativnog stresa.
- **Hidroksi radikal** (OH[•]) predstavlja jedan od najreaktivnijih kiseoničnih radikala koji ima veoma kratak poluživot *in vivo* - oko 10 sekundi. Ovaj radikal reaguje praktično sa prvim biomolekulom u svom okruženju zbog čega je vrlo toksičan.
- **Peroksi radikal** (RO₂[•]), od kojih je najjednostavniji hidroperoksi radikal ili perhidroksi radikal (HOO[•]), igra važnu ulogu u otpočinjanju procesa lipidne peroksidacije [100].

Najznačajnije RNS je azot monoksid (NO[•]) koji nastaje oksidacijom jednog od azotovih atoma u terminalnoj gvanidino grupi arginina, u reakciji koju katalizuje enzim azot monoksid sintaza [101]. NO[•] učestvuje u brojnim fiziološkim procesima u organizmu, uključujući neurotransmisiju, regulaciju relaksacije glatkih mišića, imunoregulaciju [102]. NO[•] se može prevesti u druga RNS, uključujući nitrozonijum katjon (NO⁺), nitroksilni anjon (NO⁻) i peroksinitritni anjon (ONOO⁻) [103]. Štetno dejstvo NO[•] se ogleda u fragmentaciji DNK i

oštećenju lipida, usljed njegove sposobnosti da reaguje sa superoksidnim anjonom ($\text{NO}\bullet + \bullet\text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$), pri čemu nastaje visoko reaktivni peroksinitritni anjon koji ima izraženije oksidativne osobine [104].

Oksidativni stres predstavlja stanje koje se javlja usljed poremećaja između produkcije redoks aktivnih jedinjenja i sistema zaštite, tj. povećane produkcije reaktivnih jedinjenja usljed brojnih toksina i spoljnih štetnih uticaja ili od strane ćelija imunskog sistema, kao i smanjenja količine antioksidanasa usljed npr. negativnog uticaja toksičnih agensa. Oksidativni stres može dovesti do oštećenja DNK, proteina i lipida kao i drugih biomolekula. „Redoks regulacija“ predstavlja mehanizam kojim se postiže balans između dobrih i loših efekata slobodnih radikala što predstavlja važan aspekt živih organizama. „Redoks regulacija“ održava redoks homeostazu kontrolišući redoks status *in vivo* čime štiti žive organizme od oksidativnog stresa.

Nivo reaktivnih jedinjenja, uključujući i slobodne radikale, kontroliše kompleksni sistem antioksidativne odbrane koji smanjuje oštećenje biomolekula. Neki od prirodnih mehanizama nalaze se neposredno u ćelijama, a neke unosimo putem hrane [70].

1.6.3. Antioksidansi

Antioksidansi su prirodne ili sintetske supstance koje, prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji je podložan oksidaciji, imaju sposobnost da značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju supstrata. Ova jedinjenja se razlikuju po hemijskoj strukturi i imaju različite mehanizme djelovanja koji uključuju:

- endogene enzime koji katalitički uklanjaju reaktivna jedinjenja, kao što su superoksid dismutaza i enzimi katalaze;
- komponente koje kontrolišu formiranje reaktivnih jedinjenja, npr. razgradnja proteina ili sastavljanje nosača elektrona u komplekse koji ne dozvoljavaju izlaz elektrona ka O_2 . Ova kategorija uključuje proteine koji minimiziraju dostupnost takvih prooksidansa kao što su joni gvožđa, joni bakra ili hem. Primjeri su: transferin, albumin, haptoglobin, hemopeksin, hem oksigenaza i metalotionein;
- jedinjenja koja štite biomolekule od oksidativnih oštećenja drugim mehanizmima. Primjeri su šaperoni, proteini koji prekrivaju DNK, ili enzimi koji određuju nivo polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid* - PUFA) u mitohondrijskim membranama;
- fizičko „gašenje“ reaktivnih jedinjenja npr. singleta O_2 od strane karotenoida;
- 'žrtvena jedinjenja' koja prevashodno reaguju sa reaktivnim jedinjenjima i sprečavaju ih da reaguju sa biomolekulima. Primjeri su: glutation, α -tokoferol, askorbat, urat, albumin i plazmalogen;
- reakcije reaktivnih jedinjenja sa biomolekulima dajući proizvode koji su citoprotektivni, npr. nitro-masne kiseline i neki krajnji proizvodi lipidne peroksidacije [70].

Prema prirodi i načinu djelovanja antioksidansi se dijele na:

- enzimske antioksidanse: superoksid dismutaze, glutation peroksidaza, ksantin oksidaza, katalaza, peroksidaze, glutation reduktaza, glutation-S-transferaza (primarna linija odbrane);

- neenzimske antioksidanse (sekundarna linija odbrane):
 - liposolubilni (vitamin A, vitamin E, koenzim Q, β -karoten, flavonoidi i drugi fenoli, itd.) - dejstvo ispoljavaju u lipidnoj fazi membrana kao i unutar serumskih lipoproteina;
 - hidrosolubilne (vitamin C, mokraćna kiselina, glutation, ceruloplazmin, transferin) - dejstvo ispoljavaju u vodenoj fazi tako što interaguju sa liposolubilnim antioksidansima na graničnoj površini membrana;
- reparativne enzimske antioksidanse - učestvuju u reparaciji oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (fosfolipaza A2, različiti proteinski enzimi, glikozilaze, DNK-ligaze, DNK-polimeraze i dr) [105].

1.6.4. Oksidativni stres i AIDS – antioksidativno dejstvo halkona

Kao što je prethodno navedeno oksidativni stres je uključen i u patogenezu AIDS, s obzirom da se HIV replicira u visoko oksidovanom okruženju. U istraživanjima koja su sproveli Sonnerborg, Awodele i Wanchu [106, 107, 108], u rizičnim grupama ispitanika iz nekoliko zemalja pomoću studija slučaja, studija presjeka i interventnih studija uočena je neuravnoteženost u redoks statusu ispitanika tokom infekcije. Zabilježeno je smanjenje koncentracije glutationa, tioredoksina, superoksid dismutaze, askorbinske kiseline, glutation peroksidaze, tokoferola i selena. Porast koncentracije hidroperoksida i malondialdehida zabilježen je kako kod djece tako i kod odraslih pacijenata [15].

Za povećanu produkciju ROS smatraju se odgovornim: protein omotača virusa HIV-1 Gp120, Tat, Nef, Vpr i reverzna transkriptaza. Protein omotača Gp120 pojačava proizvodnju ROS u linijama limfoidnih ćelija, endotelnim ćelijama mozga, glija ćelijama, neuronima i astrocitima. Promjene u redoks statusu pacijenata inficiranih virusom HIV-1 zahtijevaju da se u terapiju uključe i antioksidansi u ranom stadijumu bolesti [109].

Pored brojnih neželjenih efekata koje sa sobom nosi, potvrđeno je da HAART povećava oksidativni stres, te otuda potreba za razvojem antioksidativne adjuvantne terapije za pacijente sa HIV [15].

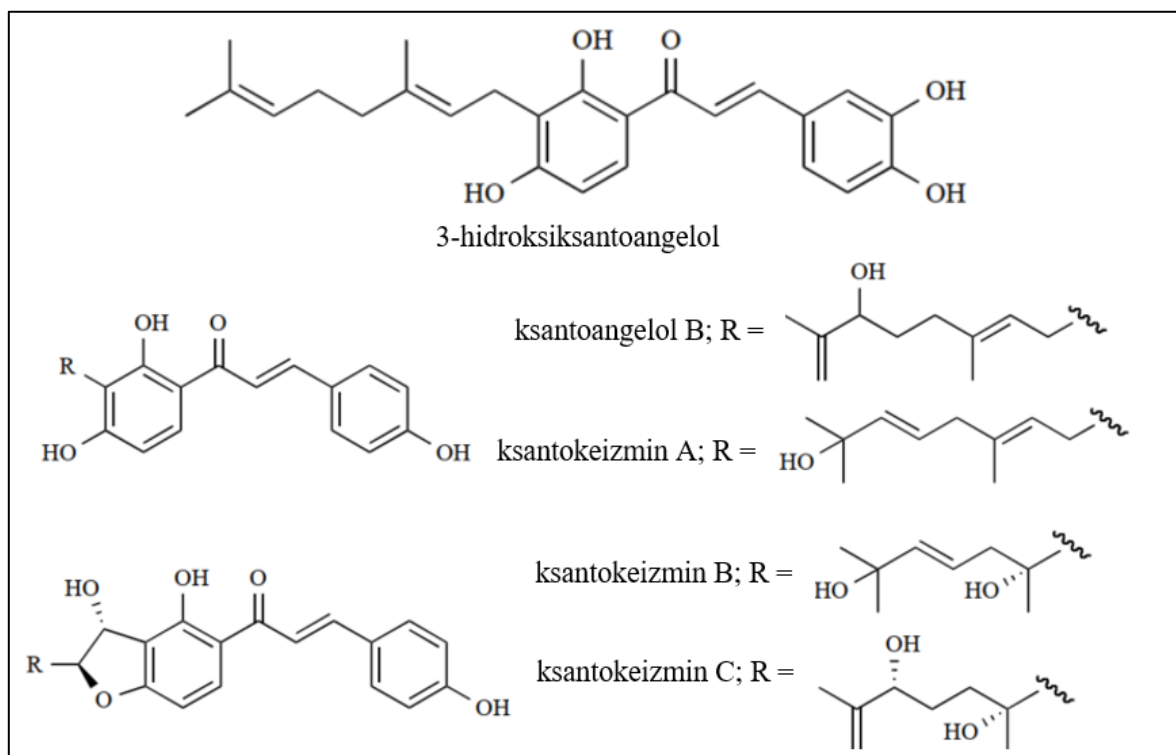
Studija sprovedena na 84 pacijenta koji su inficirani virusom HIV-1 tokom šestomjesečnog perioda primjene HAART pokazala je značajno povećanje ukupnog hidroperoksida, malondialdehida i smanjenje koncentracije glutationa u poređenju sa koncentracijom prije liječenja kao i kod zdravih ispitanika. Kod pacijenata koji su primali nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze, koncentracije peroksida bile su znatno niže nego kod onih koji su liječeni inhibitorima proteaze. To bi se moglo pripisati povećanoj potrošnji glutationa ili / i unutarćelijskom smanjenju njegovog oksidovanog oblika. Ljekovi u HAART mogu doprinijeti razvoju kardiovaskularnih bolesti i poremećajima u centralnom nervnom sistemu [109].

Tabe i saradnici su pacijentima na HAART kao adjuvantnu terapiju primijenili sok hibiskusa (*H. sabdariffa*). Biohemijske analize pokazale su porast broja bijelih krvnih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom. *H. sabdariffa* je biljka bogata flavonoidima, jedinjenjima koji čine oko 75% ukupnih polifenola prisutnih u ekstraktu ove biljke [110].

Halkoni spadaju u neenzimske antioksidanse, a njihov antioksidativni potencijal u direktnoj je vezi sa strukturom. Dva arilna prstena koja čine osnovu molekula kao i vrsta i položaj

supstituenata na njima utiču na antioksidativni potencijal ovih jedinjenja. Fenolna grupa u strukturi halkona u velikoj mjeri pojačava antioksidativnu aktivnost što se objašnjava konverzijom fenolne grupe u odgovarajuće fenoksi radikale putem mehanizma prenosa atoma vodonika [111].

Mnogi hidroksihalkoni sa izoprenil supstuentima na benzenovim prstenovima pokazuju antioksidativnu aktivnost. Derivat ksantoangelola (Slika 13), izolovan iz plodova *Artocarpus nobilis*, pokazao je jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na α -tokoferol. Ksantoangelol B i ksantokeizmini A, B i C (Slika 13), izolovani iz stabljika *Angelica keiskei*, pokazali su jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na resveratrol [112].



Slika 13. Halkoni sa antioksidativnom aktivnošću

1.7. Kvantitativni odnos strukture i dejstva (engl. *quantitative structure–activity relationship* - QSAR)

Pored pristupa baziranog na strukturi ciljnog mjesta dejstva (engl. *target-based drug design*), koji podrazumijeva poznavanje strukture ciljnog makromolekula i koji obuhvata *docking* studije, u racionalnom dizajniranju lijekova se primjenjuje i pristup baziran na strukturi liganda (engl. *ligand-based drug design*). U pitanju je pristup koji obuhvata studije kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR), 3D-QSAR kao i mapiranje farmakofora.

1.7.1. Odnos strukture i dejstva (engl. *structure activity relationships* - SAR)

Pristup u dizajniranju lijekova zasnovan na odnosu strukture i dejstva (SAR) temelji se na zapažanju da jedinjenja koja imaju strukture slične farmakološki aktivnim lijekovima su često i sama biološki aktivna. Ova aktivnost može biti ili slična onoj koju posjeduje originalno jedinjenje, ali se razlikuje po intenzitetu ili neželjenim dejstvima, ili je potpuno različita od one koju posjeduje originalno jedinjenje. SAR studija *lead* jedinjenja i njegovih analoga može se koristiti za utvrđivanje djelova strukture *lead* jedinjenja koji su odgovorni kako za njegovo korisno biološko djelovanje, odnosno za njegovu farmakoforu, tako i za njegove neželjene efekte. Ove informacije se mogu koristiti za razvoj novog lijeka koji ima veću aktivnost, različitu aktivnost od postojećeg lijeka ili za razvoj lijeka koji ima manje neželjenih dejstava [113].

SAR studije se obično izvode tako što se vrše manje promjene u strukturi *lead* jedinjenja kako bi se formirali analozi pri čemu se procjenjuju efekti koje ove strukturne promjene imaju na biološku aktivnost. Istraživanje brojnih *lead* jedinjenja i njihovih analoga dovelo je do nekoliko opštih činjenica o biološkim efektima koji nastaju kao posledica specifičnih strukturnih promjena. Ove promjene se mogu klasifikovati kao promjene [114]:

- veličine i oblika ugljovodoničnog niza (promjena broja metilenskih grupa u nizu ili prstenu; povećanje ili smanjenje stepena zasićenosti; uvođenje ili uklanjanje sistema prstena);
- vrste i stepena supstitucije (uvođenje novih funkcionalnih grupa, zamjena postojećih grupa izosternim grupama, uklanjanje tzv. 'nevažnih' funkcionalnih grupa)
- stereohemije *lead* jedinjenja.

Izbor promjena potrebnih za dobijanje analoga određenog *lead* jedinjenja vrši se razmatranjem aktivnosti jedinjenja sličnih struktura, kao i moguće hemije i biohemije predviđenog analoga. Smatra se da strukturne promjene koje rezultiraju analogima sa povećanim lipidnim osobinama mogu pokazati pojačanu aktivnost zbog boljeg prolaska kroz membranu ili smanjenu aktivnost zbog smanjenja njihove rastvorljivosti u vodi. Međutim, kakva god bila promjena, njen uticaj na rastvorljivost u vodi, transport kroz membrane, vezivanje za receptore/enzime i metabolizam i druge farmakokinetičke osobine trebala bi biti razmotrena koliko je to moguće prije nego što se krene u sintezu jedinjenja. Takođe, promjena strukture *lead* jedinjenja može rezultirati analogom koji je prevelik da bi odgovarao predviđenom ciljnom mjestu dejstva. Upotreba kompjuterskih metoda u racionalnom dizajniranju lijekova može ublažiti ovaj problem pod uslovom da je struktura ciljnog mjesta dejstva poznata ili da se može simulirati s određenim stepenom tačnosti. Međutim, treba imati

na umu da iako je moguće predvidjeti efekat strukturnih promjena, može biti mnogobrojnih izuzetaka od predviđanja, pa se svi analozi moraju sintetisati i ispitati [114].

1.7.2. Kvantitativni odnos strukture i dejstva (QSAR)

QSAR pristup u dizajniranju lijekova se zasniva na uspostavljanju matematičke povezanosti između hemijskih karakteristika i biološkog ponašanja strukturno sličnih jedinjenja. Cilj je formiranje pouzdanog matematičkog algoritma koji pruža razumnu osnovu za uspostavljanje prediktivnog modela korelacije. Osim što pruža matematičku povezanost, QSAR model omogućava i istraživanje hemijskih karakteristika kodiranih u deskriptorima. Deskriptori su numeričke vrijednosti koje predstavljaju osobine jedinjenja i pomažu u uspostavljanju matematičke korelacije. Zbog toga različite vrste deskriptora igraju značajnu ulogu u identifikaciji i analizi hemijske osnove koja je uključena u postupak koji se razmatra. Deskriptori, takođe, omogućavaju da se odgovarajućim promjenama u hemijskim strukturama izmijeni ili „prilagodi“ postojeće hemijsko ponašanje u željeno. Nadalje, u dobijanju matematičke korelacije ovakva analiza koristi hemijske informacije iz relativno malog broja jedinjenja, dok istovremeno omogućava predviđanje posmatranog odgovora za veliki broj jedinjenja. Ova posebna karakteristika je veoma važna kada se radi o biološkim (ili toksikološkim) podacima koji uključuju etička pitanja vezana za eksperimente na životinjama. QSAR se u ovom smislu pokazao vrijednom alternativnom metodom i preporuka je da se koristi za dizajn i razvoj biološki aktivnih molekula, kao i za prediktivnu toksikološku analizu [115].

Istorijski gledano, najraniji začeci ideologije QSAR modeliranja su proistekli iz jednostavnog koncepta korelacije između reakcije i hemijske prirode molekula koji je ostao isti i danas, nakon različitih razvoja i ishoda na QSAR algoritamskoj osnovi. Dvije glavne svrhe QSAR-a su razvoj matematičke jednačine ili modela i objašnjenje modeliranih hemijskih karakteristika kodiranih deskriptorima [115].

QSAR modelovanje na skupu strukturno sličnih jedinjenja se zasniva na razvoju matematičke korelacije između odgovora jedinjenja i kvantitativnih atributa koji određuju karakteristike analiziranih molekula. Otuda, takva studija pokušava uspostaviti matematičku vezu između ponašanja jedinjenja, tj. odgovora jedinjenja i skupa kvantitativnih atributa koji se mogu izvući iz hemijskih struktura eksperimentalnim ili računskim putem.

Naziv studije zavisi od prirode odgovora (poznatog i kao 'krajnja tačka' – engl. *'endpoint'*) koji se modeluje. U zavisnosti da li se modeluju fizičko-hemijske osobine, biološka aktivnost ili toksikološki podaci postoje tri glavne klase, odnosno kvantitativne studije: struktura - osobine / aktivnost / toksičnost (engl. *quantitative structure–property relationship* - QSPR / QSAR / engl. *quantitative structure–toxicity relationship* - QSTR).

Budući da je ishod QSAR-a razvijen matematički odnos, ovakve studije omogućavaju predviđanje molekulskog ponašanja za nova jedinjenja ili čak hipotetičke molekule.

QSAR metoda se može matematički predstaviti na sljedeći način (jednačina 8) [116]:

$$\text{Biološka aktivnost} = f(\text{Hemijska struktura, fizičko-hemijske osobine}) \quad (8)$$

Uzimajući u obzir upotrebu hemijskih informacija u prisustvu / odsustvu fizičko-hemijskih karakteristika, QSAR jednačina za određeni odgovor može biti matematički predstavljena na sljedeći način (jednačina 9):

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_nX_n \quad (9)$$

Y predstavlja zavisnu promjenljivu - odgovor koji se modeluje, tj. aktivnost / osobina / toksičnost, dok su X_1, X_2, \dots, X_n nezavisne promjenljive koje označavaju različite strukturne karakteristike ili fizičko-hemijske osobine u obliku numeričkih veličina ili deskriptora, a a_1, a_2, \dots, a_n su doprinosi pojedinih deskriptora odgovoru, pri čemu je a_0 konstanta.

Važan korak obrade podataka u QSAR metodi podrazumijeva logaritamsku transformaciju zavisno promjenljive (odgovora) koja omogućava konverziju širokog raspona podataka odgovora (aktivnost / osobina / toksičnost) u manji obim. Drugi razlog za logaritamsku konverziju podataka je taj što biološki / toksikološki podaci daju parabolichnu krivu za odnos doza - odgovor, dok odgovarajući logaritamski odnos doza - odgovor za iste podatke daje sigmoidnu krivu koja pokazuje linearni srednji dio što olakšava modelovanje. Dodatan korak obrade podataka obično uključuje nekoliko operacija prethodne obrade (prije razvoja modela), kao što su uklanjanje međusobno povezanih osobina i podjela skupa podataka. Upravo odabir deskriptora za QSAR analizu predstavlja veliki izazov jer je većina deskriptora korelisana. Često različiti deskriptori daju istu informaciju pa se informacija ponavlja tj. javlja se tzv. redundantna informacija. Neki od primjera korelisanih deskriptora su: molekululska masa, površina molekula, molarna refraktivnost, pa se prilikom formiranja QSAR modela preporučuje odabir jednog od navedenih deskriptora. Jedan od preduslova formiranja robusnog QSAR modela podrazumijeva i odabir nekorelisanih deskriptora [117]. Matrica podataka koja se sastoji od odgovora i deskriptora može biti predmet linearnog i nelinearnog razvoja modela u kombinaciji sa odgovarajućim algoritmom za izbor karakteristika. Multipla linearna regresiona analiza (engl. *multiple linear regression* - MLR) i parcijalna regresiona analiza najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares regresion* - PLS) su reprezentativne tehnike za razvoj linearnih korelacijskih modela, dok genetski algoritam (engl. *genetic algorithm* - GA), može poslužiti za selekciju promjenljivih (tj. izbor karakteristika). Pristupi nelinearnog modelovanja uključuju vještačku neuronsku mrežu (engl. *artificial neural network* - ANN), algoritam potpornih vektora (engl. *support vector machine* - SVM) itd [116, 117].

Razvoj modela podrazumijeva obradu značajnog broja podataka, što ukazuje na potrebu da studije budu povezane sa odgovarajućim statističkim testovima. Kako bi se procijenio kvalitet QSAR modela koriste se različiti statistički parametri: koeficijent determinacije (R^2), korijen srednje kvadratne greške (engl. *root mean square error* - RMSE), unakrsni validacijski koeficijent korelacije (Q^2), p-vrijednost.

Završna operacija, tj. interpretacija razvijenog modela je od presudne važnosti i zahtijeva temeljno znanje o biohemijskim aspektima molekula prema modelovanju odgovora. QSAR modelovanje na kraju pokušava uspostaviti hemijsku osnovu za specifične pojave kao što su aktivnost, osobina ili toksičnost razvijanjem odgovarajuće korelacione jednačine ili modela. Budući da se pretpostavlja da sva jedinjenja u skupu podataka djeluju na isti način u odnosu na specifični odgovor, uspostavljanje mehanističkog temelja omogućava: predviđanje odgovora postojećih neispitanih ili novih jedinjenja i dizajn i razvoj potpuno novih jedinjenja

koja posjeduju željeni profil aktivnosti / osobine / toksičnosti. Inkorporacija matematičkog algoritma čini QSAR tehniku racionalnim alatom [115].

1.7.3. Molekulski deskriptori

QSAR predstavlja matematički model koji povezuje hemijsku strukturu i biološku aktivnost molekula koristeći različite računski ili eksperimentalno izvedene kvantitativne parametre tj. "deskriptore". Molekulski deskriptori su pojmovi koji karakterišu specifične informacije ispitivanih molekula. To su numeričke vrijednosti, povezane sa hemijskom konstitucijom, za korelaciju hemijske strukture sa različitim fizičkim osobinama, hemijskom reaktivnošću ili biološkom aktivnošću. Razvijena jednačina treba da obezbijedi uvid u suštinske strukturne zahtjeve za molekule, koji doprinose biološkom odgovoru ispitivanih molekula [118]. Drugim riječima, odgovor jedinjenja se može matematički predstaviti kao funkcija deskriptora (jednačina 10):

$$\begin{aligned} &\text{Aktivnost (odgovor / osobina / toksičnost)} \\ &= f(\text{Molekulske informacije dobijene iz hemijske strukture ili fizičko-hemijskih osobina}) \\ &= f(\text{Deskriptori}) \end{aligned} \quad (10)$$

Idealan deskriptor bi trebao da posjeduje sljedeće karakteristike kako bi se mogao koristiti prilikom formiranja pouzdanog QSAR modela:

- Deskriptor treba da bude relevantan za široku klasu jedinjenja.
- Deskriptor mora biti u korelaciji sa ispitivanim biološkim odgovorima, dok ilustruje značajnu povezanost sa drugim deskriptorima.
- Izračunavanje deskriptora treba da bude brzo i nezavisno od eksperimentalnih osobina.
- Deskriptor treba da proizvede različite vrijednosti za strukturno različite molekule, čak i ako su strukturne razlike male.
- Deskriptor treba da posjeduje fizičku interpretaciju da bi odredio karakteristike upita za ispitivana jedinjenja [115].

Postoji više tipova deskriptora u zavisnosti od načina njihovog izračunavanja ili određivanja: fizičko-hemijski (hidrofobni, sterni ili elektronski), strukturni (učestalost pojave određene substrukture), topološki, elektronski (molekulsko orbitalni proračuni), geometrijski (proračuni molekulske površine).

Šire gledano, deskriptore (konkretno, fizičko-hemijske deskriptore) možemo svrstati u dvije glavne grupe: supstituentne konstante i cijelomolekulski deskriptori [119, 120]. Supstituentne konstante su u osnovi fizičko-hemijski deskriptori koji su dizajnirani na osnovu faktora koji određuju fizičko-hemijske osobine hemijskog entiteta.

Cijelomolekulski deskriptori predstavljaju proširenje pristupa supstituentne konstantne, ali mnogi od njih su takođe izvedeni iz eksperimentalnih pristupa [115].

Deskriptori se takođe mogu podijeliti i u zavisnosti od načina na koji se izračunavaju:

- nulti deskriptori (0D) – najjednostavniji, dobijaju se iz molekulske formule i nezavisni su od molekulske strukture (odnose se na vrstu i broj atoma i veza, molekulska masa);
- jednodimenzionalni deskriptori (1D) – odnose se na fragmente koji su značajni za molekul (broj primarnih, sekundarnih, tercijarnih, kvaternarnih C atoma);

- dvodimenzionalni deskriptori (2D) – opisuju dvodimenzionalnu strukturu i mogu biti topološki, strukturni, fizičko-hemijski uključujući i termodinamičke deskriptore (Zagreb indeks, Balaban J indeks, broj rotirajućih veza, particioni koeficijent);
 - trodimenzionalni deskriptori (3D) – opisuju prostornu orijentaciju i konformaciju molekula (elektronski parametri, prostorni parametri).
- Pored navedenih deskriptora postoje i deskriptori viših dimenzija (4D, 5D, 6D, 7D) [121].

1.7.4. 3D-QSAR

Klasični QSAR pristup se oslanja na Hansch-ov metod (biološki odgovor je korelisan sa atomima, grupama, ili molekulskim osobinama kao što su lipofilnost, elektronske ili sterne osobine) ili Free-Wilson-ov metod (biološki odgovor je korelisan sa određenim strukturnim karakteristikama). Međutim, nijedna od ovih tehnika ne razmatra trodimenzionalnu (3D) strukturu molekula zbog čega imaju ograničenu primjenu u dizajniranju različitih funkcionalno novih molekula. Kao posljedica toga, 3D-QSAR se pojavio kao prirodni nastavak klasičnog Hansch-ovog i Free-Wilson-ovog pristupa. 3D-QSAR koristi 3D osobine liganda u predviđanju biološkog odgovora, uz primjenu robusnih hemometrijskih alata. 3D-QSAR je širok pojam koji obuhvata sve one QSAR metode koje povezuju makroskopske osobine ciljnog mjesta sa izračunatim deskriptorima zasnovanim na atomima, izvedenim iz prostornog prikaza molekulskih struktura. Ovi pristupi su poslužili kao dragocjeno prediktivno sredstvo u dizajniranju lijekova i jedinjenja koja se koriste u poljoprivredi.

Glavni cilj bilo koje 3D-QSAR metode je uspostavljanje odnosa između biološke aktivnosti i prostornih osobina jedinjenja poput sternih, elektrostatičnih i lipofilnih. 3D-QSAR metodologija je računski mnogo iscrpnija i složenija od 2D-QSAR pristupa. Obično se sastoji od nekoliko koraka za dobijanje numeričkih deskriptora iz složenih struktura:

1. Potrebno je utvrditi optimalnu (blizu bioaktivne) konformaciju jedinjenja, bilo iz eksperimentalnih podataka (*X-ray* ili NMR struktura) ili iz teorijskog alata poput molekularne mehanike, a zatim se mora izvršiti optimizacija energije.
2. Poravnavanje konformera u skupu podataka mora biti izvršeno u 3D prostoru.
3. Za generisanje različitih deskriptora računarski se istražuje prostor sa pozicioniranim konformerom.
4. Konačno, izračunati deskriptori treba da budu u korelaciji sa eksperimentalnim biološkim odgovorom ispitivanih jedinjenja [122].

1.7.5. *GRid-INdependent* Deskriptori (GRIND)

Tradicionalne metode za izvođenje 3D-QSAR oslanjaju se na korak poravnanja koji je obično dugotrajan, podložan pristranosti korisnika što može da rezultira modelom koji je zavisn i osjetljiv na upotrijebljeno poravnanje. Postoji nekoliko metoda koje prevazilaze ovaj problem, ali, generalno, potrebne transformacije sprečavaju jednostavnu interpretaciju rezultirajućih modela u originalnom prostoru deskriptora (tj. 3D molekulске koordinate).

GRid-INdependent Deskriptori (GRIND) su primjer novih 3D molekulskih deskriptora. Prvobitno su razvijeni za 3D-QSAR, ali su sa uspjehom primijenjeni i u drugim oblastima dizajna lijekova. GRIND deskriptori su izuzetno relevantni za opis bioloških osobina

jedinjenja, nezavisni su od poravnanja i lako se računaju. Dobijaju se iz interakcionih polja molekula (engl. *Molecular Interaction Fields* - MIFs) koja se izračunavaju, sa ciljem pronalaženje reprezentativnih pozicija (engl. *hot spots*). Postupak za izračunavanje deskriptora uključuje prvi korak, u kojem su polja pojednostavljena, i drugi korak, u kojem se rezultati kodiraju u promjenljive, nezavisne od poravnanja (primjenom određene vrste autokorelacione transformacije). Tako dobijeni molekulski deskriptori mogu se koristiti za dobijanje grafičkih dijagrama zvanih "korelogrami" i mogu se koristiti u različitim hemometrijskim analizama, kao što su PCA ili PLS. Važna karakteristika GRIND-a je što se upotrebom odgovarajućeg softvera originalni deskriptori (MIFs) mogu regenerirati iz autokorelacione transformacije. Rezultati analize se predstavljaju grafički zajedno sa originalnim molekulskim strukturama u 3D graficima [123, 124].

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Dizajniranje novih nepeptidnih inhibitora HIV-1 proteaze:

- Pretraživanje baze podataka *Protein data Bank* u cilju potraživanja kristalografske ili NMR strukture HIV-1 proteaze kao osnove za izvođenje *docking* eksperimenata;
- Primjena kompjuterskih programa *ChemOffice v7.0.0 Ultra* za optimizaciju komercijalno dostupnih inhibitora HIV proteaze, osnovnih *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-onkih struktura i mono-, di- i tri supstituisanih *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-onkih struktura;
- Primjena kompjuterskog programa *AutoDock Vina* za izvođenje *docking* eksperimenata i ispitivanje potencijalnih interakcija derivata *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-on (halkona) sa aminokiselinama u aktivnom mjestu HIV-1 proteaze kao i uticaja različitih supstituenata na pozicioniranje i formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mjestu;
- Izbor polaznih *orto*- i *para*-, mono- i di- supstituisanih benzaldehida kao i *orto*- i *para*-, mono- i di- supstituisanih acetofenona na osnovu izvedenih *docking* studija.

2. Sinteza propiofenonskih derivata (halkona):

- Optimizacija uslova za izvođenja aldolne kondenzacije;
- Optimizacija uslova za praćenje toka sinteze (TLC) i prečišćavanje sintetisanih jedinjenja (preparativna hromatografija na koloni i preparativna TLC);
- Karakterizacija novosintetisanih jedinjenja primjenom hromatografskih i spektroskopskih metoda (TLC, ATR-FTIR, ^1H i ^{13}C NMR, MS-MS).

3. Određivanje lipofilnosti novosintetisanih halkona:

- Eksperimentalno određivanje particionih koeficijenata ($\text{Log}P$) halkona primjenom reverzno-fazne tankoslojne hromatografije (RP-TLC);
- Veza između hromatografski određenih parametara lipofilnosti (R^M_0 , C_0 i S) i izračunatih $\text{Log}P$ vrijednosti;
- Formiranje QSPR i QSRR modela;
- Primjena multivarijantnih hemometrijskih metoda: višestruka linearna regresija (engl. *Multiple linear regression* - MLR) i parcijalna regresija najmanjih kvadrata (engl. *Partial least squares regression* - PLSR) u cilju ispitivanja veze između kompjuterski izračunatih molekulskih deskriptora i parametara lipofilnosti.

4. *In vitro* ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih halkona fluorimetrijskom metodom, primjenom komercijalno dostupnog kita SensoLyte® 490 HIV-1 Protease Assay Kit (fluorimetric) (AnaSpec, Fremont, SAD).

5. Ispitivanje redoks aktivnosti novosintetisanih halkona u serumskom pulu zdravih ispitanika:

- Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (parametri, pokazatelji oksidativnog stresa: totalni oksidativni status - TOS; prooksidativno-

antioksidativni balans - PAB; parametri, pokazatelji antioksidativne zaštite: totalni antioksidativni status - TAS; koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa - SHG);

- Ispitivanje promjena redoks statusa uzoraka serumskog pula pod uticajem ispitivanih jedinjenja računanjem oksidativnog skora primjenom z-skor statistike.

6. Izvođenje studija kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva propiofenonskih derivata:

- Formiranje i validacija 3D-QSAR modela u cilju identifikacije farmakofora sa najvećim uticajem na anti-HIV-1 proteaznu aktivnost.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Molekulski *docking* derivata propiofenona

3.1.1. Računarski programi

- *ChemDraw Ultra 7.0* (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>, 2002),
- *Chem3D Ultra 7.0* program (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>, 2002),
- *MarvinSketch 19.19* (ChemAxon, 2019, <http://www.chemaxon.com>),
- *UCSF Chimera v1* (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, 2006),
- *AutoDockTools 1.5.6* (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, <http://autodock.scripps.edu/>),
- *AutoDock Vina* (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, <http://vina.scripps.edu/>),
- *Discovery Studio Visualizer 2017* (BIOVIA, <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>).

3.1.2. Molekulsko modelovanje i *docking* simulacija

Docking eksperimenti su izvedeni primjenom programa *AutoDock Vina* u 3D strukturi aktivnog mjesta HIV proteaze. 3D struktura HIV proteaze kokristalisana sa (*S*)-*N*-(3-fluoro-2-(2-(1-(fenilsulfonil)piperazin-2-il)etil)fenil)-3,3-bis(4-fluorofenil)propanamid (PDB kod: 6B36) je preuzeta iz baze podataka *RCSB Protein Data Bank*.

Strukture svih ispitivanih jedinjenja pripremljene su korišćenjem programskog paketa *ChemOffice Ultra 7.0* i optimizovane *MOPAC* metodom.

Strukture ciljnog mjesta i liganada za *docking* proračune pripremljene su primjenom *AutoDockTools 1.5.6* (*ADT*).

Koordinatna mreža, dimenzija 40 x 30 x 40 tačaka sa međusobnim razmakom između tačaka 0,375 Å, postavljena je u centar aktivnog mjesta. Koordinate koje su tom prilikom generisane ($x = -13.817$, $y = 21.182$, $z = -7.163$) sačuvane su i korišćene za *docking* izračunavanja ispitivanih jedinjenja.

Nakon obrade u *AutoDock Vina*, za svako ispitivano jedinjenje kreiran je *out.pdbqt* fajl sa konformacijama. Za svako ispitivano jedinjenje generisano je 9 konformacionih položaja i najvjerovatnija konformacija određena na osnovu najvišeg afiniteta vezivanja (engl. *binding affinity*).

Validacija izvedene *docking* studije izvršena je poređenjem konformacije liganda iz kokristala sa ciljnim mjestom (koja je određena primjenom *X-ray* difrakcije) sa konformacijom iz *docking* proračuna (*dock*-ovana poza) računanjem devijacija kvadratnog korijena srednje vrijednosti (RMSD) između ove dvije konformacije primjenom računarskog programa *UCSF Chimera v1*. Vrijednost RMSD treba da bude manja od 2 Å.

Primjenom računarskog programa *Discovery Studio Visualizer 2017* izvršena je vizuelizacija interakcija ispitivanih jedinjenja sa ciljnim mjestom.

3.2. Sinteza derivata propiofenona i njihova strukturna analiza

3.2.1. Reagensi

- 2-hidroksiacetofenon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- 4-(trifluorometil)benzaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- 3- metilbenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 2- metilbenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 4-fluoro-2-metilbenzaldehyd (Sigma-Aldrich, Co, SAD),
- 2-fluorobenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 2- metoksibenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 2- hlorobenzaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- 2,6-dihlorobenzaldehyd (Fluka AG, Švajcarska),
- 2,4-dihlorobenzaldehyd (Fluka AG, Švajcarska),
- 2-hidroksibenzaldehyd (Fluka AG, Švajcarska),
- benzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 4-fluorobenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 4-metilbenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 2-trifluorometilbenzaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- 2,6-dimetoksibenzaldehyd (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- 2-nitrobenzaldehyd (Fluka AG, Švajcarska),
- 4-nitrobenzaldehyd (Fluka AG, Švajcarska),
- 2'-hidroksi-4'-metilacetofenon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- 2-trifluorometil-4-fluorobenzaldehyd (Sigma-Aldrich, Co, SAD),
- 2',6'-dihidroksiacetofenon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- 2-fluoro-3-(trifluorometil)benzaldehyd (Acros Organics, SAD),
- 3-metilbenzaldehyd (Fluka AG, Švajcarska),
- 1-(5-fluoro-2-hidroksifenil)etan-1-on (Maybridge, UK),
- 3-fluorobenzaldehyd (Merck SchuchardtOHG, Njemačka),
- hlorovodonična kiselina 35%, HCl (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- natrijum-hidroksid, NaOH (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- metanol, CH₃OH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- metanol, CH₃OH (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- acetonitril, CH₃CN, ACN (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- etilacetat, CH₃COOC₂H₅ (Carlo Erba, Rodano, Italija),
- mravlja kiselina 98%, HCOOH (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Njemačka),
- etanol 96%, C₂H₅OH (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- toluen o-CH₃C₆H₅ (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- n-heksan, C₆H₁₂ (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- natrijum-sulfat, anhidrovani, Na₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- deuterisani hloroform, CDCl₃ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),

- tetrametilsilan, TMS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- silikagel 60 za hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,063-0,200 mm (70-230 mesch), veličina pore 100 Å) (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- silikagel 60 za *dry flash* hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,035-0,075 mm (220-440 mesch), veličina pore 60 Å) (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- Silikagel GF₂₅₄ za tankoslojnu hromatografiju sa 13% CaSO₄ i fluorescentnim indikatorom (Fluka, Neu-Ulm, Njemačka),
- TLC silikagel 60 F₂₅₄ ploče 20x20 cm (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- Whatman® indikatorski papir, pH opseg 0-14 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- filter papir (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka).

3.2.2. Oprema i aparati

- analitička vaga, AdventurerTM-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD),
- magnetna miješalica, Tehnica Rotamix SHP-10 (Zelesniki, Slovenija),
- rotacioni vakuum uparivač, ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska),
- vakuum pumpa, KifLab, Laboport (KNF NeubergerGmbH, Njemačka),
- aparat za određivanje temperature topljenja, Boetius PHMK 05 (Njemačka),
- UV lampa, UV-Cabinet II (Camag, Švajcarska),
- ATR-FTIR spektrofotometar Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD),
- NMR BRUKER AVANCE III 400 (Bruker, Biospin GmbH, Rheisled, Njemačka),
- UHPLC-MS-MS aparat – tečni hromatograf spregnut sa triplkvadripolskim masenim detektorom (ThermoScientific, USA, Accela 1000 TSQ Quantum Access Max).

3.2.3. Priprema rastvora koji su korišćeni u sintezi

30% rastvor natrijum-hidroksida u vodi

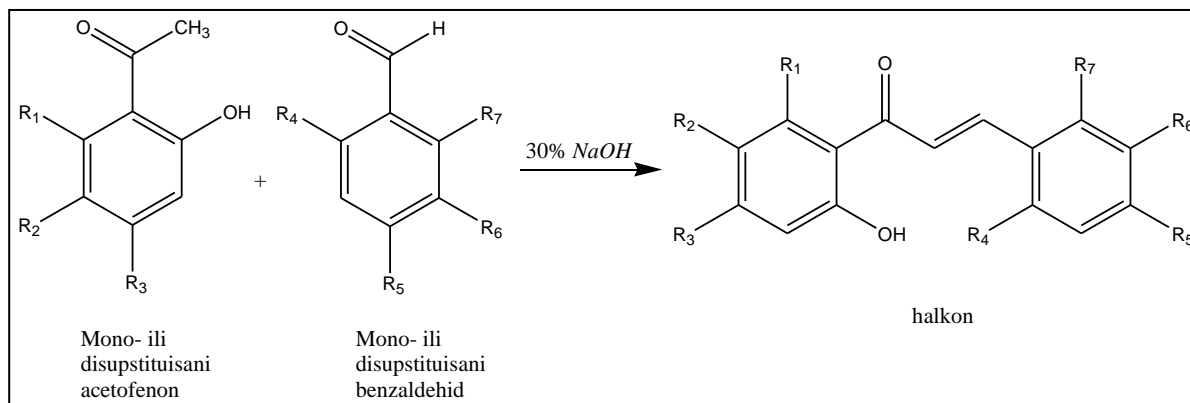
U suv erlenmajer zapremine 200 ml prenese se prethodno odmjerenih 30,0 g natrijum-hidroksida *p.a.*, uz hlađenje i miješanje staklenim štapićem postepeno se doda 60 ml destilovane vode do rastvaranja, a zatim i preostalih 10 ml vode. Reagens se priprema *ex tempore*.

1M rastvor hlorovodonične kiseline

Oko 500 ml vode se prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 8,5 ml 35 % hlorovodonične kiseline, *p.a.* i sud vodom dopuni do oznake.

3.2.4. Opšti postupak sinteze *orto*-, *para*- ili *meta*-, mono ili disupstituisanih derivata propiofenona (halkona)

Bazno katalizovana reakcija aldolne kondenzacije mono ili disupstituisanog 2-hidroksiacetofenona i *orto*-, *para*- ili *meta*-, mono- ili disupstituisanog benzaldehida u literaturi je poznata kao *Claisen-Schmidt*-ova kondenzacija [125, 126, 127] (Shema 1).



Shema 1. Sinteza halkona

U suv balon sa okruglim dnom zapremine 100 ml, u kome se nalazi magnet za miješanje, odmjeri se i prenese 10 ml 96% etanola i uz neprekidno miješanje doda 1,40 g (0,012 mola) mono ili di-supstituisanog 2-hidroksiacetofenona i ona masa *orto*-, *meta*- ili *para*-, mono- ili disupstituisanog benzaldehida koja odgovara 0,01 molu istog. U reakcionu smjesu se uz neprekidno miješanje u malim porcijama doda 20 g 30% rastvora NaOH i ostavi na sobnoj temperaturi da se miješa preko noći. Nastaje natrijumova so halkona koja se izdvaja kao narandžasti talog ili suspenzija u vodeno alkoholnoj smješi. Reakciona smjesa se ostavi da stoji u frižideru na 4-8 °C 24 h, uz povremeno miješanje snažnim protresanjem. Smjesa se razblaži dodatkom ledene vode i zakiseli hladnom 1 mol/l HCl do pH smješe oko 3 (pH se provjerava univerzalnom lakmus hartijom). Izdvaja se talog žute ili mrke boje, sirovi halkon, koji se procijedi na vakuumu i ispira ledenom vodom do neutralne reakcije kako bi se odstranila zaostala kiselina. Talog se prelije sa oko 5 ml ohlađenog 96% etanola i ostavi da se suši na vazduhu, na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetlosti.

Sirovi halkon se prečišćava preparativnom *dry flash* hromatografijom na koloni ili preparativnom tankoslojnom hromatografijom na silikagelu, sa eluentom koji čini smjesa heksana i etilacetata u zapreminskom odnosu 30 : 1. Uklanjanjem eluenta pod sniženim pritiskom na rotacionom vakuum uparivaču dobija se čist *trans* izomer halkona u obliku žutog ili mrkog kristalnog praška (potvrđeno ¹H NMR; $J_{\text{vinil H}} = 15-16$ Hz). Prekristalizacija sintetisanih jedinjenja izvedena je iz etanola.

3.2.5. Strukturna analiza

Metodom trenutnog topljenja određene su temperature topljenja sintetisanih halkona.

Na FT-IR aparatu Nicolet iS10 uz primjenu ATR modula SMART iTR opremljenog dijamantskim kristalom, metodom atenuisane refleksije snimljeni su spektri sintetisanih jedinjenja i analizirani primjenom računarskog programa *OMNIC 8.0*.

NMR spektri (^1H , ^{13}C) su snimljeni na aparatu NMR BRUKER 400. Hemijska pomijeranja određena su u odnosu na TMS kao interni standard, a uzorci sintetisanih supstanci rastvoreni su u CDCl_3 .

MS-MS fragmentacija izvršena je na UHPLC-MS-MS sistemu opremljenim UHPLC tečnim hromatografom ACCELA i triplkvadripolskim MS-MS detektorom. Kao mobilna faza korišćena je smješa metanol : 0,1% mravlja kiselina (90:10 v/v). Masena spektrometrija izvršena je primjenom elektron sprej jonizacije u pozitivnom ili negativnom modu. Nakon optimizacije metode napon u detektoru podešen je na 5000 V, temperatura u izvoru na 378 °C, a u kapilari na 152 °C. Pritisak azota kao nosača podešen je na 30 bara. Kolizijska energija je povećavana od 0 do 60 eV u 10 koraka.

3.3. Određivanje lipofilnosti derivata propiofenona primjenom RP-TLC i kompjuterskih metoda

3.3.1. Reagensi

- acetonitril, CH₃CN (HPLC grade, Fisher Scientific, Loughborough, UK),
- etanol 96%, C₂H₅OH (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- aceton (CH₃)₂O (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poljska),
- destilovana voda (Farmaceutski fakultet),
- dimetil sulfoksid (DMSO), (CH₃)₂SO (Fisher Scientific, Loughborough, UK),
- metanol, CH₃OH (Fisher Scientific, Loughborough, UK).

3.3.2. Oprema i aparati

- analitička vaga, AdventurerTM -Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD),
- ultrazvučno kupatilo, Sonic, Ultrasonic cleaner, Sineks Laboratory,
- hromatografske kade (Camag, Švajcarska),
- RP-18 F254s aluminijumske ploče 10 × 10 cm (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- UV-CABINET II (Camag, Švajcarska).

3.3.3. Računarski programi

- *ChemDraw Ultra 8.0* (CambridgeSoft Corporation, 2005, <http://www.cambridgesoft.com>),
- *Microsoft Office Excel* (Microsoft Corporation 2010 <http://www.microsoft.com>),
- *MarvinSketch 15.1.26* (ChemAxon, 2015, <http://www.chemaxon.com>),
- *ChemDes* (CBDD Group, 2020, <http://www.scbdd.com/chemdes/>),
- *Statistica 13* (TIBCO Software Inc., 2017, <http://statistica.io>).

3.3.4. Priprema rastvora za hromatografsku analizu

Osnovni rastvori halkona

Rastvori se oko 5 mg ispitivanog jedinjenja u 2,5 ml dimetilsulfoksida (c= 2 mg/ml).

Radna razblaženja

Prenese se 0,5 ml Osnovnog rastvora halkona u odmjerni sud od 10 ml i isti dopuni metanolom do oznake (c = 0,1 mg/ml).

3.3.5. Hromatografska analiza

Tankoslojna hromatografska analiza je izvedena na komercijalno dostupnim pločama dimenzija 10 × 10 cm. Stacionarna faza je reverzno-fazni silikagel 60 RP-18 F254s (Merck,

Darmstadt, Njemačka). Mobilne faze su dvokomponentne smješe organskih rastvarača i vode čiji je sastav prikazan u tabeli 2.

Tabela 2. Korišćeni RP-TLC sistemi

RP-TLC sistem	Stacionarna faza	Mobilna faza (zapreminski udio organske komponente i vode, v/v)
I	Oktadecilsilil silikagel	Acetonitril–voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80:20)
II		Etanol–voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80:20)
III		Aceton–voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80:20)

Na hromatografske ploče je nanošeno po 5 µl svježe pripremljenih radnih razblaženja halkona.

Prije razvijanja hromatograma, hromatografske kade zasićene su parama mobilne faze, tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Hromatogrami su razvijani ascedentnom tehnikom. Nakon razvijanja hromatograma, hromatografske ploče su sušene na sobnoj temperaturi, a hromatografske zone detektovane pod UV lampom, na talasnoj dužini $\lambda = 254$ nm.

Na osnovu dva mjerenja izračunate su R_f , a zatim i R_M vrijednosti za svako od ispitivanih jedinjenja prema jednačinama (11 i 12):

$$R_f = \frac{l}{l_0} \quad (11)$$

Gdje je:

l – rastojanje od starta do centra zone koja odgovara ispitivanom jedinjenju (cm)

l_0 – rastojanje od starta do fronta mobilne faze (cm)

$$R_M = \text{Log}\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (12)$$

R_M^0 vrijednost (R_M u hipotetičkom sistemu koji sadrži 0% organskog modifikatora), određena je ekstrapolacijom iz jednačine (13):

$$R_M = R_M^0 + S\phi \quad (13)$$

gdje je S nagib prave, a ϕ procentni udio organskog rastvarača u mobilnoj fazi.

Parametar C_0 - koncentracija organskog modifikatora u mobilnoj fazi za koju je raspodjela supstance između dvije faze jednaka ($R_f = 0,5$; $R_M = 0$) izračunava se na osnovu jednačine (14):

$$C_0 = - \frac{R_M^0}{S} \quad (14)$$

3.3.6. Izračunavanje vrijednosti LogP primjenom kompjuterskih programa

Za izračunavanje vrijednosti LogP ispitivanih jedinjenja korišćeni su kompjuterski programi *ChemDraw 8* (*Viswanadhan LogP*, *Brotto LogP*, *Crippen LogP* i *CLogP*) i *MarvinSketch*.

3.3.7. Geometrijska optimizacija i izračunavanje molekulskih deskriptora

Za geometrijsku optimizaciju ispitivanih jedinjenja i izračunavanje *Chemo Py* (1D, 2D i 3D molekulskih deskriptora [128] korišćena je besplatna web platforma *ChemDes*, sa inkorporiranim *MOPAC* softverom [129].

Primjenom web platforme *ChemDes* izračunato je ukupno 873 *Chemo Py* 1D, 2D i 3D molekulskih deskriptora od kojih su za formiranje QSRR modela primjenom algoritma *Feature selection and variable screening (FSVS)*, implementiranog u programu *Statistica 13* odabrani topološki 2D deskriptori koji pripadaju: *Burden*-ovim, *Moreau-Broto* i *kappa* deskriptorima [128].

3.3.8. QSRR analiza

Za formiranje MLR (C_0), PLS (C_0) i SVM (C_0) modela korišten je *Softver Statistica 13*.

U QSRR analizi, parametar C_0 za hromatografski sistem acetonitril-voda, uzet je kao zavisno promjenljiva (Y), dok su izračunati molekulski deskriptori uzeti kao nezavisne promjenljive (X).

U formiranje PLS (C_0) modela uključeno je 30 fizičko-hemijskih i topoloških 2D i 3D *Chemopy* deskriptora (bcutv9, bcutv7, Chiv8, Chiv5, Chiv4, Chiv7, Chiv6, Chiv1, Chiv3, bcutm8, bcutm2, ATSp3, ATSp7, ATSp6, ATSp4, ATSp8, bcutv15, bcutv16, bcutv10, MR, bcutp16, bcutp10, Smax53, LogP2, LogP, Smin53, bcutp9, bcutp7, Chiv4pc, MATSp6) koji su odabrani na osnovu R^2 (Y) i kumulativnih R^2 (Y) vrijednosti za svaku nezavisnu promjenljivu.

MLR (C_0) i SVM (C_0) modeli formirani su korišćenjem 3 topološka 2D deskriptora (bcutp8, ATSp4 i kappam2).

U toku formiranja i validacije modela 25 ispitivanih jedinjenja podijeljeno je u dva seta: test set od 5 i trening set od 20 jedinjenja.

Procjena pouzdanosti kreiranih QSRR modela izvedena je na osnovu sljedećih statističkih parametara: RMSEE (engl. *root mean squared error of estimation*), RMSEP (engl. *root mean squared error of prediction*), F odnos, p vrijednost, r, Q^2 (jednačina (15)) i R^2_{pred} (jednačina (16)).

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(training)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (15)$$

$$R^2_{pred} = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (16)$$

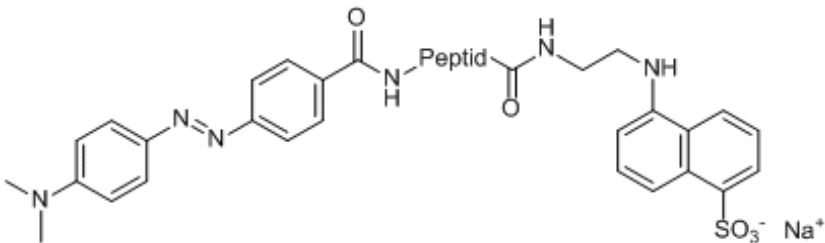
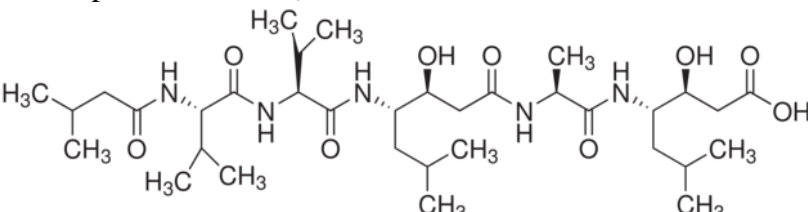
$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (17)$$

3.4. *In vitro* ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti derivata propiofenona

3.4.1. Reagensi i ispitivana jedinjenja

- SensoLyte® 490 kit za ispitivanje HIV-1 proteazne aktivnosti (AnaSpec, Fremont, SAD) koga čine: Komponente A, B, C, D, E, F i G (Tabela 3),

Tabela 3. Komponente kita

Komponenta A	<p>supstrat HIV-1 proteaze (EDANS/DABCYL FRET peptid) 5-[(2-aminoetil)amino]naftalen-1-sulfonat-<i>Gln-Val-Ile-Pro-Tyr-Asn-Gln-Ser-GABA-4'</i>-dimetil-aminoazobenzen-4-karboksilat)</p>  <p style="text-align: center;">DABCYL-Peptid EDANS</p>
Komponenta B	Fluorescentni referentni standard 5-[(2-aminoetil)amino]naftalen-1-sulfonat (EDANS)
Komponenta C	<p>Pepstatin A (izovaleril-<i>L</i>-valil-<i>L</i>-valil-[(3<i>S</i>,4<i>S</i>)-4-amino-3-hidroksi-6-metilheptanoil]-<i>L</i>-alanil[3<i>S</i>,4<i>S</i>)-4-amino-3-hidroksi-6-metilheptanska kiselina)</p> 
Komponenta D	2X pufer (20mM tris(hidroksimetil)aminometan, (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ i 2mM EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kiselina)
Komponenta E	1 M HCl (hlorovodonična kiselina) (<i>Stop</i> rastvor)
Komponenta F	dimetilsulfoksid (DMSO)
Komponenta G	1M rastvor DTT (ditiotreitol, (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1,4-Bis(sulfanil)butan-2,3-diol)

- HIV-1 proteaza, His *tagged*, rekombinantna, rastvor koncentracije 200 µg/ml (Sigma-Aldrich, SAD),
- dejonizovana voda (Niederelbert, Njemačka),

- ispitivana jedinjenja:
C1-L42-A14; C2-L21-A15; C3-L23-A16; C4-L27-A17; C5-L23-A18; C6-L48-A4; C7-L20-A19; C8-L22-A20; C9-A21; C10-L26-A22; C11-L51-A9; C12-L17-A23; C13-L52-A6; C14-L18-A24; C15-A1; C16-L14-A25; C17-L63-A7; C18-A5; C19-L19-A26; C20-L46-A-27; C21-L16-A-28; C22-L13-A-29; C24-L47; C25-L12-A-30;
- registrovani inhibitori HIV proteaze:
lopinavir, radni standard, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);
ritonavir, radni standard, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);
darunavir, radni standard, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

3.4.2. Oprema i aparati

- analitička vaga, Adventurer Pro (Ohaus, USA),
- ultrazvučno kupatilo, Sonic, Ultrasonic cleaner, Sineks Laboratory,
- Infinite M200 Pro čitač mikroploča (Tecan, Švajcarska),
- mikroploča, 384-bazenčića (Microfluor® 1, Thermo Scientific, Švajcarska),
- Wallac 1296-003 Delfia® šejker (Heidolph, Njemačka).

3.4.3. Priprema radnih rastvora

Priprema radnog pufera (1XAB)

U sud od 20 ml prenese se 5 ml komponente D, 10 µl komponente G i 5 ml dejonizovane vode.

Napomena: Reagens se priprema *ex tempore*.

Priprema rastvora supstrata

U sud zapremine 5 ml prenese se 100 µl, komponenta A i 4,9 ml radnog pufera 1XAB.

Priprema rastvora enzima

U sud zapremine 5 ml prenese se 50 µl 200 µg/ml rastvora enzima i doda u 4950 µl radnog pufera 1XAB.

Napomena: Rastvor se: 1. Ne smije vorteksirati; 2. Priprema *ex tempore*; 3. Tokom rada enzim se čuva na ledu; 4. Produženo čuvanje razblaženog rastvora enzima ili vorteksiranje dovodi do denaturacije enzima.

Priprema osnovnih rastvora ispitivanih jedinjenja

Odmjeri se masa ispitivanog jedinjenja koja odgovara količini od 5 mM, prenese u odmjerni sud od 5 ml, doda 4 ml DMSO, mućka u ultrazvučnom kupatilu do rastvaranja (oko 5 minuta) i sud do oznake dopuni DMSO (c = 1mM).

Priprema radnih razblaženja ispitivanih jedinjenja

Radna razblaženja ispitivanih jedinjenja dobijaju se razblaživanjem Osnovnih rastvora postupkom serijskog razblaživanja 1 : 2 radnim puferom 1XAB (Tabela 4).

Tabela 4. Priprema radnih razblaženja ispitivanih jedinjenja

Koncentracija (µg/ml)	Razblaženja	Osnovni rastvor (ml)	Razblaženja (ml)					
			1	2	3	4	5	6
100	1	1	-	-	-	-	-	-
10	2	-	1	-	-	-	-	-
1	3	-	-	1	-	-	-	-
0,5	4	-	-	-	5	-	-	-
0,1	5	-	-	-	-	2	-	-
0,01	6	-	-	-	-	-	1	-
0,001	7	-	-	-	-	-	-	1

Do 10 ml sudovi se dopunjavaju radnim puferom 1XAB

Priprema osnovnih rastvora registrovanih inhibitora HIV proteaze

Odmjeri se masa lopinavira, darunavira i ritonavira, koja odgovara količini od 5 mM, prenese redom u tri odmjerna suda od 5 ml, u svaki sud doda 4 ml DMSO, mućka u ultrazvučnom kupatilu do rastvaranja (oko 5 minuta) i sudovi do oznake se dopune sa DMSO (c = 1mM).

Priprema radnih razblaženja registrovanih inhibitora HIV proteaze

Radna razblaženja registrovanih inhibitora HIV proteaze dobijaju se razblaživanjem Osnovnih rastvora postupkom serijskog razblaživanja 1 : 2 radnim puferom 1XAB (Tabela 4).

Priprema Osnovnog rastvora Pepstatina A

U bočicu sa sadržajem Pepstatina A (komponenta C) doda se 20 µl DMSO i sadržaj se rastvori uz vorteksiranje. Koncentracija pripremljenog rastvora je 2 mmol/l.

Priprema radnog razblaženje Pepstatina A

Radno razblaženje Pepstatina A priprema se razblaživanjem Osnovnog rastvora Pepstatina A u radnom puferu 1XAB do koncentracije od 2 µmol/l.

Napomena: Reagens se priprema *ex tempore*.

Priprema Osnovnog rastvora fluorescentnog referentnog standarda EDANS

U odmjerni sud od 10 ml prenese se 100 µl komponente D (100 µM EDANS) i sud do oznake dopuni radnim puferom 1XAB (c =1 µmol/l).

Priprema radnih razblaženja fluorescentnog referentnog standarda EDANS

Radna razblaženja fluorescentnog referentnog standarda dobijaju se serijskim razblaživanjem 1 : 2 Osnovnog rastvora fluorescentnog referentnog standarda radnim puferom 1XAB pri čemu se dobijaju koncentracije 500,00; 250,00; 125,00; 62,50; 21,25 i 15,63 nmol/l.

3.4.4. Izvođenje enzimske reakcije

Ispitivanja su izvedena na mikrotitar ploči sa 384 bazenčića, u triplikatu. Sintetisani halkoni i registrovani inhibitori HIV proteaze ispitivani su u rasponu koncentracija od 0,001 do 100 μM). Kalibracija instrumenta postignuta je korišćenjem EDANS fluorescentnog referentnog standarda u rasponu koncentracije od 15,63 do 500 nM. Za indukciju reakcije, korišćen je komercijalno dostupan rekombinantni enzim HIV-1 proteaza.

Protokol ispitivanja prikazan je na slici 14.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
A	SP	IC	S1 C4	S3 C2	TI 10		I2 C1	I3 C4	I5 C2	I6 C5	I8 C3	I10 C1	I11 C4	I13 C2	I14 C5	I16 C3	I18 C1	I19 C4	I21 C2	I22 C5	I24 C3
B	SP	IC	S1 C5	S3 C3	TI 11		I2 C2	I3 C5	I5 C3	I7 C1	I8 C4	I10 C2	I11 C5	I13 C3	I15 C1	I16 C4	I18 C2	I19 C5	I21 C3	I23 C1	I24 C4
C	ST 500	VC	S3 C5	S3 C3	TI 12		I2 C2	I3 C5	I5 C3	I7 C1	I8 C4	I10 C2	I11 C5	I13 C3	I15 C1	I16 C4	I18 C2	I19 C5	I21 C3	I23 C1	I24 C4
D	ST 500	VC	S2 C1	S3 C4	TI 13		I2 C3	I4 C1	I5 C4	I7 C2	I8 C5	I10 C3	I12 C1	I13 C4	I15 C2	I16 C5	I18 C3	I20 C1	I21 C4	I23 C2	I24 C5
E	ST 250	SC	S2 C1	S3 C4	TI 14		I2 C3	I4 C1	I5 C4	I7 C2	I8 C5	I10 C3	I12 C1	I13 C4	I15 C2	I16 C5	I18 C3	I20 C1	I21 C4	I23 C2	I24 C5
F	ST 250	SC	S2 C2	S3 C5	TI 15	I1 C1	I2 C4	I4 C2	I5 C5	I7 C3	I9 C1	I10 C4	I12 C2	I13 C5	I15 C3	I17 C1	I18 C4	I20 C2	I21 C5	I23 C3	I25 C1
G	ST 125	TC S1	S2 C2	S3 C5	TI 16	I1 C1	I2 C4	I4 C2	I5 C5	I7 C3	I9 C1	I10 C4	I12 C2	I13 C5	I15 C3	I17 C1	I18 C4	I20 C2	I21 C5	I23 C3	I25 C1
H	ST 125	TC S2	S2 C3	TI 1	TI 17	I1 C2	I2 C5	I4 C3	I6 C1	I7 C4	I9 C2	I10 C5	I12 C3	I14 C1	I15 C4	I17 C2	I18 C5	I20 C3	I22 C1	I23 C4	I25 C2
I	ST 62,5	TC S3	S2 C3	TI 2	TI 18	I1 C2	I2 C5	I4 C3	I6 C1	I7 C4	I9 C2	I10 C5	I12 C3	I14 C1	I15 C4	I17 C2	I18 C5	I20 C3	I22 C1	I23 C4	I25 C2
J	ST 62,5	S1 C1	S2 C4	TI 3	TI 19	I1 C3	I3 C1	I4 C4	I6 C2	I7 C5	I9 C3	I11 C1	I12 C4	I14 C2	I15 C5	I17 C3	I19 C1	I20 C4	I22 C2	I23 C5	I25 C3
K	ST 31,2	S1 C1	S2 C4	TI 4	TI 20	I1 C3	I3 C1	I4 C4	I6 C2	I7 C5	I9 C3	I11 C1	I12 C4	I14 C2	I15 C5	I17 C3	I19 C1	I20 C4	I22 C2	I23 C5	I25 C3
L	ST 31,2	S1 C2	S2 C5	TI 5	TI 21	I1 C4	I3 C2	I4 C5	I6 C3	I8 C1	I9 C4	I11 C2	I12 C5	I14 C3	I16 C1	I17 C4	I19 C2	I20 C5	I22 C3	I24 C1	I25 C4
M	ST 15,6	S1 C2	S2 C5	TI 6	TI 22	I1 C4	I3 C2	I4 C5	I6 C3	I8 C1	I9 C4	I11 C2	I12 C5	I14 C3	I16 C1	I17 C4	I19 C2	I20 C5	I22 C3	I24 C1	I25 C4
N	ST 15,6	S1 C3	S3 C1	TI 7	TI 23	I1 C5	I3 C3	I5 C1	I6 C4	I8 C2	I9 C5	I11 C3	I13 C1	I14 C4	I16 C2	I17 C13	I19 C3	I21 C1	I22 C4	I24 C2	I25 C5
O	+C	S1 C3	S3 C1	TI 8	TI 24	I1 C5	I3 C3	I5 C1	I6 C4	I8 C2	I9 C5	I11 C3	I13 C1	I14 C4	I16 C2	I17 C13	I19 C3	I21 C1	I22 C4	I24 C2	I25 C5
P	+C	S1 C4	S3 C2	TI 9	TI 25	I2 C1	I3 C4	I5 C2	I6 C5	I8 C3	I10 C1	I11 C4	I13 C2	I14 C5	I16 C3	I18 C1	I19 C4	I21 C2	I22 C5	I24 C3	

Slika 14. Protokol ispitivanja inhibitorne aktivnosti registrovanih inhibitora HIV proteaze i sintetisanih halkona (SP – slijepa proba (8 µl radnog pufera 1XAB, 10 µl rastvora enzima i 2 µl DMSO); ST- fluorescentni referentni standard EDANS (10 µl radnog razblaženja fluorescentnog referentnog standarda i 10 µl rastvora supstrata); +C – pozitivna kontrola – rastvor enzima (10 µl rastvora enzima i 10 µl rastvora radnog pufera 1XAB); IC - kontrola inhibitora Pepstatina A – 10 µl rastvora enzima HIV-proteaze, 2 µl Pepstatina A i 8 µl rastvora radnog pufera 1XAB; VC – 18 µl radnog pufera 1XAB i 2 µl DMSO kao rastvarača; SC – 20 µl radnog pufera 1XAB; TCS (1-3) – kontrola registrovanih inhibitora HIV proteaze (2 µl radnog razblaženja registrovanog inhibitora i 18 µl radnog pufera 1XAB); TI (1-25) – kontrola sintetisanih halkona (2 µl radnog razblaženja ispitivanog halkona i 18 µl radnog pufera 1XAB); S1-3C1-5-registrovani inhibitori HIV proteaze, ispitivani u pet različitih koncentracija (2 µl radnog razblaženja registrovanih inhibitora HIV proteaze, 10 µl rastvora enzima i 8 µl radnog pufera 1XAB)); I1 –25C1-5 –sintetisani halkoni, ispitivani u pet različitih koncentracija (2 µl radnog razblaženja ispitivanog halkona, 10 µl rastvora enzima i 8 µl radnog pufera 1XAB))

Preinkubacija

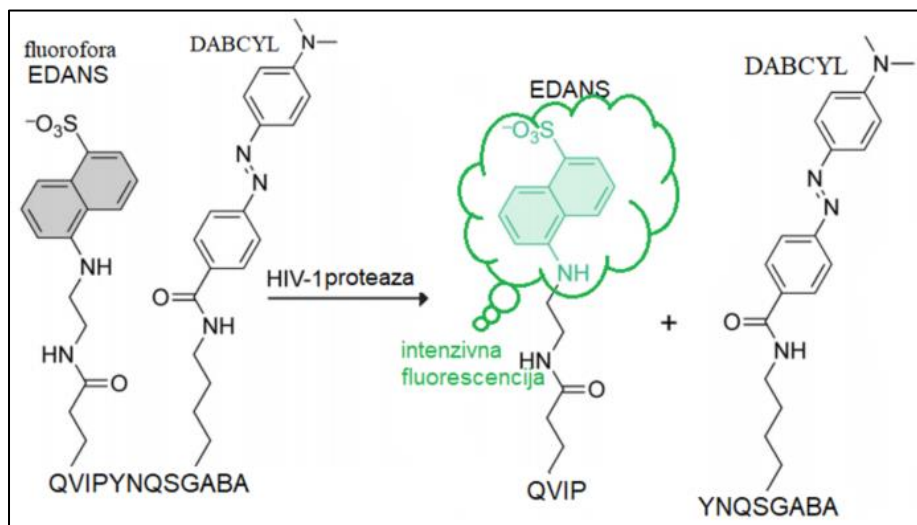
Pripremljena mikrotitar ploča (Slika 14) se inkubira 10-15 minuta na sobnoj temperaturi. Na istoj temperaturi se inkubira i rastvor supstrata za HIV-1 proteazu.

Iniciranje enzimske reakcije

Aktivnost enzima uzrokovala je razgradnju supstrata i povećanje fluorescencije, što je oslabljeno prisustvom inhibitora u uzorcima, u skladu sa aktivnostima ispitivanih inhibitora. U svaki bazenčić doda se po 10 μ l rastvora supstrata za HIV-1 proteazu, ploča postavi na šejker 30-60 sekundi kako bi se sadržaj u bazenčićima homogenizovao.

Reakciona smjesa se inkubira na sobnoj temperaturi tokom 30-60 minuta zaštićena od svjetlosti.

Supstrat za HIV-1 proteazu je sintetski peptid (Slika 15) čiju peptidnu vezu Tyr-Pro HIV-1 proteaza hidrolizuje formirajući dva odvojena fragmenta: EDANS-QVIP i DABCYL-YNQSGABA. Oslobođeni fragment EDANS-QVIP fluorescira na $E_m=490\pm 30$ nm (Slika 15) [130].



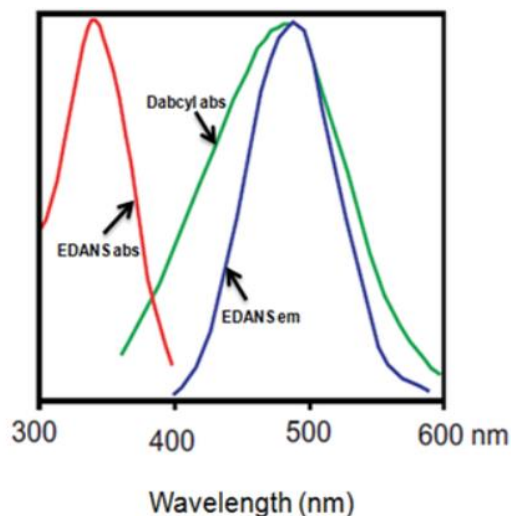
Slika 15. Proteolitičko cijepanje EDANS/DABCYL FRET peptida u prisustvu HIV-1 proteaze (QVPYNQSGABA=-Gln-Val-Ile-Pro-Tyr-Asn-Gln-Ser-GABA)

Određivanje inhibitorne koncentracije

Fluorimetrijski test zasniva se na FRET mehanizmu (fluorescentni rezonantni transfer energije, engl. *fluorescence resonance energy transfer* - FRET). FRET mehanizam obuhvata transfer energije međumolekulskim dipol-dipol interakcijama sa jedne fluorofore na drugu. Donorska fluorofora (molekul donor) je pobuđena i emituje energiju, dok se na akceptorsku (molekul akceptor) energija prenosi [131].

Iako postoji mnogo faktora koji utiču na FRET, primarni uslovi koji moraju biti ispunjeni da bi se FRET ostvario su sledeći:

- Molekuli donora i akceptora moraju biti u neposrednoj blizini (obično 10-100 Å, tj. 1-10 nm).
- Spektar apsorpcije ili pobuđivanja akceptora mora se preklapati sa spektrom fluorescentne emisije donora (Slika 16).



Slika 16. Preklapanje spektra apsorpcije akceptora sa spektrom fluorescentne emisije donora

(Preuzeto i prilagođeno iz Guo J, Xu C, Li X, Chen S. A Simple, Rapid and Sensitive FRET Assay for Botulinum Neurotoxin Serotype B Detection. PLoS ONE. 2014;9(12),e114124)

EDANS/DABCIL je široko korišćen par donor-akceptor *gasitelj*. Optimalne talasne dužine apsorpcije i emisije EDANS su $\lambda_{\text{abs}} = 336 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$, a za DABCIL je maksimalna talasna dužina apsorpcije $\lambda_{\text{abs}} = 472 \text{ nm}$, koja se u velikoj mjeri preklapa sa emisivnim spektrom EDANS-a (Slika 16). Studijom apsorpcije i emisije EDANS/ DABCIL utvrđeno je da je primarni zahtjev za FRET ispunjen jer postoji odlično preklapanje između fluorescentnog spektra donora (EDANS) i spektra apsorpcije akceptora (DABCIL) [132]. Kada se nalaze u neposrednoj blizini (10–100Å), energija koja se emituje iz EDANS-a *ugasiće* se DABCIL-om, što kao rezultat ima zanemarljivu fluorescenciju ili njen izostanak. Kada proteaza hidrolizuje peptid, molekuli EDANS-a i DABCIL-a se razdvajaju i udaljavaju jedan od drugog, a fluorescencija EDANS-a će se povećati srazmjerno količini hidrolizovanog peptida tj. enzimskoj aktivnosti.

Po završetku inkubacije, u svaki bazenčić na mikrotitar ploči dodaje se po 10 μl *Stop* rastvora (komponenta E), ploča se pažljivo postavi na šejker, sadržaj u bazenčićima homogenizuje u trajanju od 30 sekundi, nakon čega se ploča postavlja u Infinite M200 Pro čitač mikroploča i fluorescencija EDANS segmenta mjeri pobuđivanjem na 340 nm i posmatranjem emisije na 490 nm ($E_x/E_m = 340 \pm 30 \text{ nm}/490 \pm 30 \text{ nm}$).

Od očitanih vrijednosti fluorescencija za sintetisane halkone, registrovane inhibitore HIV proteaze oduzima se vrijednost očitavane fluorescencije za kontrolu supstrata (pozadinska fluorescencija). Na taj način se dobija tzv. RFU vrijednost (relativna fluorescentna jedinica).

Procenat relativne aktivnosti enzima (% RA) za ispitivana jedinjenja za svih pet koncentracija izračunava se prema formuli (18):

$$\%RA = (\text{RFU jedinjenja} / \text{RFU EDANS}_{100\%}) * 100 \quad (18)$$

Koncentracija pri kojoj je vrijednost % RA 50% predstavlja IC₅₀ vrijednost.

3.5. QSAR analiza anti-HIV1-proteazne aktivnosti

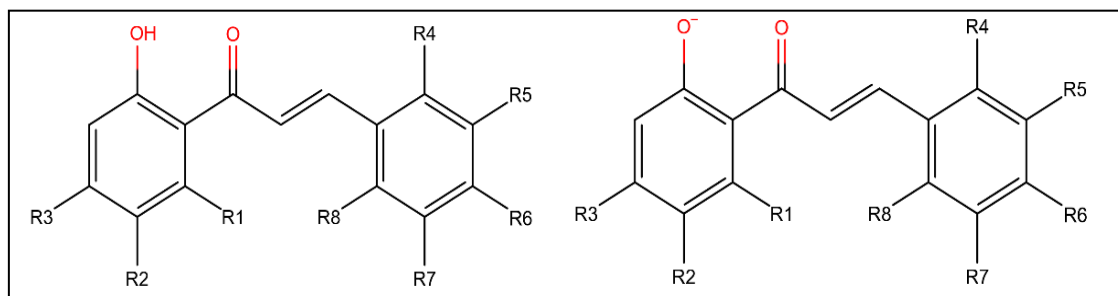
3.5.1. Računarski programi

- *MarvinSketch 19.0* (ChemAxon, 2020, <http://www.chemaxon.com>),
- *Gaussian 98 (Revision A.7)* (Gaussian, Inc., Pittsburgh, SAD 1998),
- *Chem3D Ultra 7.0* (CambridgeSoft Corporation, 2002, <http://www.cambridgesoft.com>),
- *Pentacle, Version 1.0.7* (Molecular Discovery Ltd., 2009, <http://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>),
- *PASW Statistics 18.0* (SPSS, Inc., Chicago, SAD, 2009),
- *ADMET Predictor v9.5* (Simulations Plus, Inc., Lancaster, SAD, 2019).

3.5.2. Formiranje 3-D QSAR modela

Strukture ispitivanih jedinjenja (navedena u poglavlju 3.4.1. Reagensi i ispitivana jedinjenja) su optimizovane korišćenjem programa *Gaussian 98W* semiempirijskom metodom PM3 (*Parametric Method 3*), a zatim metodom DFT (teorija funkcionalne gustine) B3LYP/6-31 (d, p), u *Chem3D Ultra 7.0* grafičkom interfejsu.

Program *Marvin Sketch 19.0* je korišćen za određivanje pKa vrijednosti ispitivanih jedinjenja i grafika raspodjele oblika jedinjenja na fiziološkom pH. Dobijeni grafici raspodjele ukazuju da je podjednaka zastupljenost molekulskog i jonskog oblika, te su u daljim proračunima korišćena oba oblika (Slika 17).



Slika 17. Opšta strukturalna formula nejonizovanih i jonizovanih oblika ispitivanih halkona

Za formiranje 3D-QSAR modela korišćen je program *Pentacle 1.0.7*. Model je kreiran pomoću PLS regresione metode. Ovaj program koristi *GRIND* deskriptore kao nezavisne promjenljive, i negativne logaritamske vrijednosti inhibitornih koncentracija (pIC_{50}) određene u *in vitro* ispitivanjima anti-HIV proteazne aktivnosti, kao zavisne promjenljive. Interakciona polja molekula se dobijaju korišćenjem četiri hemijske probe (mali molekuli ili fragmenti) koje simuliraju interakcije ispitivanih jedinjenja sa ciljnim mjestom dejstva: *DRY* proba (opisuje hidrofobnu interakciju), *O* proba (simulira karbonylni kiseonik, akceptor vodonične veze) predstavlja akceptor vodonične veze, *NI* (simulira amidni azot, donor vodonične veze) predstavlja donor vodonične veze i *TIP* proba (opisuje sternu interakciju

uzimajući u obzir oblik molekula). Korišćena je 3D mreža sa jediničnim rastojanjem od 0,5 Å između tačaka.

Najvažnija područja koja predstavljaju povoljne interakcije između probe i liganda razdvojena su korištenjem *ALMOND* algoritma [133] koji se zasniva na intenzitetu polja i udaljenosti između odabranih centara. Broj filtriranih čvorova postavljen je na 100% i 50% relativnih težinskih faktora. CLACC (engl. *Consistently Large Auto and Cross Correlation*) metodologija [134] izdvaja najkonzistentnije varijable u nizu strukturno povezanih molekula koristeći auto- i unakrsnu korelaciju između čvorova. Manje značajne varijable su uklonjene primjenom algoritma FFD (engl. *Fractional Factorial Design*) u PLS jednačini sve dok smanjenje broja varijabli nije uticalo na poboljšanje statističkih parametara modela.

3.5.3. Validacija modela

Interna validacija je urađena izračunavanjem R^2 , Q^2 , RMSEE parametara, dok su za eksternu validaciju računati parametri R^2_{pred} i RMSEP (Vidjeti poglavlje 3.3.8. QSRR analiza).

Za dodatnu verifikaciju, prediktivna sposobnost modela izračunata je dodatnim parametrima: r^2_m , $r^{/2}_m$, $\overline{r^2_m}$ and Δr^2_m (jednačine 19 i 20) [135, 136].

$$r^2_m = r^2 \left(1 - \sqrt{|r^2 - r_0^2|} \right) \quad (19)$$

$$r^{/2}_m = r^2 \left(1 - \sqrt{|r^2 - r_0^{/2}|} \right) \quad (20)$$

Kriterijumi prihvatljivosti predviđanja formiranog 3D-QSAR modela su: R^2_{pred} , r^2_m , $r^{/2}_m$ i $\overline{r^2_m}$ vrijednosti veće od 0,5, a vrijednost Δr^2_m manja od 0,2 [136].

Da bi se osigurala pouzdana primjena kreiranog 3D-QSAR modela, definisan je domen primjenljivosti (engl. *Applicability Domain* - AD) [137]. Za definisanje domena primjenljivosti korišćen je softver *SPSS v.18.0* i *leverage* pristup koji omogućava provjeru sposobnosti predviđanja modela, izračunavanjem vrijednosti uticaja h i upoređivanjem s kritičnom vrijednošću h^* . Kritična vrijednost se izračunava pomoću jednačine (21):

$$h^* = \frac{3(p + 1)}{n} \quad (21)$$

u kojoj je p broj varijabli modela, a n je broj struktura korišćenih za pravljenje modela. Softver *SPSS v.18.0* i *leverage* pristup su korišćeni u predviđanju aktivnosti novo dizajniranih struktura.

3.5.4. *In silico* ispitivanje ADMET osobina

ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost) karakteristike ispitivanih i novo dizajniranih jedinjenja su predviđene u programu *ADMET Predictor 9.5*.

3.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti derivata propiofenona

3.6.1. Oprema i aparati

- analitička vaga (Adventurer™ –Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD),
- magnetna mješalica (Tehtnica Rotamix SHP-10, Zelezniki, Slovenija),
- mikrotitraciona ploča sa 96 mjesta (Sarstedt, Njemačka),
- ELISA čitač (BioTek, USA, ELx800 Absorbance Microplate Reader),
- vorteks mješalica (VELP Scientifica, Italy, TIP new zx),
- ultrazvučno kupatilo (Argo lab, Italija).

3.6.2. Reagensi

- dimetilsulfoksid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- etilacetat (Merck, Njemačka),
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoeva kiselina) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- natrijum-hidroksid (Hemoss, Srbija),
- terc-butilhidroperoksid 70% (Acros organics, SAD),
- destilovana voda (Farmaceutski fakultet),
- hlorovodonična kiselina 35% (Merck, Njemačka),
- 2,2-azobis(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- vodonik peroksid (Merck, Njemačka),
- natrijum-hlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- ksilenol-oranž (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- glicerol (Merck, Njemačka),
- feroamonijum-sulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- sumporna kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka),
- dianizidin-dihidrohlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- mokraćna kiselina (Merck, Njemačka),
- kalijum-hidrogenfosfat (Merck, Njemačka),
- EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- hloramin T (Acros Organics, Geel, Belgija),
- enzim peroksidaza (Acros Organics, Geel, Belgija).

3.6.3. Biološki materijal

- Serumski pul dobijen miješanjem seruma zdravih osoba, pripadnika kontrolne grupe. Uzorci su zamrzavani na -20°C nakon alikvotiranja i čuvani najviše dvije nedjelje, do završetka eksperimenta.

3.6.4. Priprema rastvora i reagenasa

Rastvori ispitivanih hakona

Odmjeri se 10 mg halkona i prenese se u odmjerni sud od 10 ml, doda 5 ml dimetilsulfoksida i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Sud se do oznake dopuni istim rastvaračem.

0,25 mmol/l rastvor tercbutilhidroperoksida (TBH)

U odmjerni sud od 10 ml prenese se 0,5 µl koncentrovanog TBH i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

0,40 mol/l rastvor natrijum-acetata

Odmjeri se 32,8 g bezvodnog natrijum-acetata, prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 500 ml destilovane vode i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Sud se do oznake dopuni destilovanom vodom.

10 mmol/l rastvor natrijum-hidroksida

Odmjeri se 0,20 g natrijum-hidroksida, prenese u odmjerni sud od 500 ml, pažljivo uz hlađenje suda doda 250 ml destilovane vode i mućka do potpunog rastvaranja. Sud se do oznake dopuni destilovanom vodom.

0,20 mol/l rastvor dikalijum-hidrogenfosfata

Odmjeri se 17,42 g dikalijum-hidrogenfosfata, prenese u odmjerni sud od 500 ml, doda 250 ml destilovane vode i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Sud se do oznake dopuni destilovanom vodom.

2 mmol/l rastvor dinatrijum-etilendiaminotetrasirćetne kiseline (EDTA)

Odmjeri se 0,292 g dinatrijum-etilendiaminotetrasirćetne kiseline, prenese u odmjerni sud od 500 ml, doda 250 ml destilovane vode i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Sud se do oznake dopuni destilovanom vodom.

25 mmol/l rastvor sumporne kiseline

U odmjerni sud od 1000 ml prenese se 500 ml destilovane vode, doda 1,4 ml sumporne kiseline i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

100 mmol/l rastvor hloramina T

Odmjeri se 0,227 g hloramina T, prenese u odmjerni sud od 10 ml, doda 5 ml destilovane vode i mućka do potpunog rastvaranja. Sud se do oznake dopuni destilovanom vodom.

Napomena: Rastvor se priprema *ex tempore*.

2 mmol/l rastvor vodonik peroksida

U odmjerni sud od 200 ml prenese se 3 ml 30% vodonik peroksida i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

Napomena: Rastvor se priprema *ex tempore*.

1 mmol/l rastvor vodonik peroksida

U odmjerni sud od 200 ml prenese se 100 ml 2 mmol/l rastvor vodonik peroksida i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

Napomena: Rastvor se priprema *ex tempore*.

30 mM acetatni pufer, pH= 3,6

Odmjeri se 2,46 g bezvodnog natrijum-acetata, prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 900 ml destilovane vode i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Podese se pH rastvora na 3,6 dodatkom glacijalne sirćetne kiseline i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

0,05 M acetatni pufer, pH = 4,5

Odmjeri se 4,2 g bezvodnog natrijum-acetata, prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 900 ml destilovane vode i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Podese se pH rastvora na 4,5 dodatkom glacijalne sirćetne kiseline i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

0,05 M acetatni pufer, pH = 5,6

Odmjeri se 4,2 g bezvodnog natrijum-acetata, prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 900 ml destilovane vode i mućka u ultrazvučnom kupatilu do potpunog rastvaranja. Podese se pH rastvora na 5,6 dodatkom glacijalne sirćetne kiseline i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

Reagens 1: Acetatni pufer (pH = 5,8; 0,4 mol/l)

Odmjeri se 940 ml natrijum acetata (0,4 mol/l) i 60 ml sirćetne kiseline (0,4 mol/l) za 1000 ml rastvora pri čemu se prvo dodaje bazna komponenta, a potom kisela, dok se ne postigne potrebna pH vrijednost. Rastvor pufera je stabilan šest mjeseci na temperaturi od 4°C.

Reagens 2: Rastvor ABTS [2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)]

Odmjeri se 0,549 g ABTS-a i rastvori u 100 ml smješe koju čini 30 mM acetatni pufer pH=3,6 i 2mM H₂O₂ u zapreminskom odnosu 3:7 (koncentracija rastvora ABTS-a je 10 mmol/l). Ovaj rastvor se inkubira 1h na sobnoj temperaturi, dok ne dobije karakterističnu intenzivnu plavo-zelenu boju ABTS+ jona. Ovako pripremljen reagens je stabilan šest mjeseci na 4°C.

Reagens 1 - TOS 1

Odmjeri se 114 mg ksilenol-oranža i 8,18 g natrijum-hlorida, prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 900 ml rastvora 25 mM sumporne kiseline i rastvori u ultrazvučnom kupatilu. U tako dobijeni rastvor doda se 100 ml glicerola i pH vrijednost reagensa podese na 1,75.

Reagens 2 - TOS 2

Odmjeri se 1,96 g feroamonijum-sulfata i 3,17 g *o*-dianizidin-dihidrohlorida, prenese u odmjerni sud od 1000 ml, doda 700 ml 25 mM sumporne kiseline, rastvori u ultrazvučnom kupatilu i sud do oznake dopuni istim rastvaračem.

TMB I rastvor

Odmjeri se 60 mg TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), prenese u odmjerni sud od 10 ml i rastvori u dimetilsulfoksidu. Rastvor se podijeli u manje porcije zapremine od 1,1 ml i čuva na -20°C.

TMB katjon

U odmjerni sud od 50 ml prenese se 1 ml TMB I rastvora i 175 µl svježe pripremljenog 100 mmol/l rastvora hloramin T i sud do oznake dopuni 0,05M acetatnim puferom pH 4,5. Rastvor se dobro promućka i inkubira na 37°C na tamnom mjestu, uz stalno miješanje u trajanju od jednog sata. Nakon inkubacije, u 50 ml TMB katjona doda se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor se pažljivo promiješa, podijeli u zapremine od 1,1 ml i čuva na temperaturi od -20 °C.

TMB II rastvor

U odmjerni sud od 10 ml prenese se 200 µl rastvora TMB I rastvora i sud do oznake dopuni 0,05 M acetatnim puferom pH 5,6.

Napomena: Ovaj rastvor je najbolje koristiti odmah nakon pripreme ili maksimalno u roku od 2 dana, pri čemu se čuva na temperaturi od 4°C.

Radni rastvor za određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

U 10 ml TMB rastvora II se doda 1 ml TMB katjona i miješa 6 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetlosti.

Napomena: Rastvor se priprema i upotrebljava *ex tempore*.

Standardni rastvor za određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

Priprema standardnih rastvora prikazana je u tabeli 5. Rastvori se pripremaju miješanjem 1 mM rastvora vodonik peroksida sa 6 mM rastvorom mokraćne kiseline pripremljenim u 10 mM NaOH) u različitim zapreminskim odnosima.

Tabela 5. Priprema standardnog rastvora za određivanje PAB-a

Standardni rastvor	1	2	3	4	5
Mokraćna kiselina (µl)	100	75	50	25	0
Vodonik peroksid (µl)	0	25	50	75	100

Radna razblaženja rastvora glutationa

Radna razblaženja rastvora glutationa pripremaju se razblaživanjem 1 mM rastvora standarda glutationa vodom pri čemu se dobijaju rastvori koncentracija od 0,1 mM do 1 mM.

Fosfatni pufer, 50 mmol/l, pH = 7

Odmjeri se 0,68 g kalijum-dihidrogenfosfata, prenese u odmjerni sud od 100 ml, doda 50 ml destilovane vode, mućka u ultrazvučnom kupatilu do rastvaranja i sud do oznake dopuni destilovanom vodom.

Odmjeri se 0,871 g dikalijum-hidrogenfosfata, prenese u odmjerni sud od 100 ml, doda 50 ml destilovane vode, mućka u ultrazvučnom kupatilu do rastvaranja i sud do oznake dopuni destilovanom vodom. Rastvor se prenese u čašu i pH podesi na 7,0 rastvorom kalijum-dihidrogenfosfata.

DTNB reagens 10 mM

U odmjerni sud od 1000 ml prenese se 3,96 g DTNB (5,5'-ditio-bis-[2-nitrobenzojeva kiselina]) i rastvori u 50 mM fosfatnom puferu, pH = 7,0.

Fosfatni pufer, pH 9,0

0,2 mol/l K_2HPO_4 se pomiješa sa 2 mmol/l EDTA i po potrebi se pH vrijednost podesi na 9 dodatkom kiseline ili baze.

Priprema seruma za analize

Serum za analize dobijen je iz pune krvi. Bolje odvajanje supernatanta (seruma) od koaguluma vrši se centrifugiranjem 15 minuta na 3000 obrtaja. Serum je sakupljan od većeg broja zdravih ispitanika, homogenizovan i alikvotiran, kako bi se obezbijedilo dovoljno materijala sa jednakim karakteristikama.

Ukoliko se analiza izvodi istoga dana dobijeni serum se čuva na temperaturi od +4°C. Ukoliko se analize izvode nakon 48h i više serum se čuva na temperaturi od -80°C.

Ispitivani uzorci seruma su podijeljeni u dvije grupe:

- jednu grupu čine uzorci seruma u koje je dodat rastvor halkona;
- drugu grupu čine uzorci seruma u koje je pored rastvora halkona dodat i rastvor sintetskog prooksidansa TBH.

Uzorci se pripremaju u duplikatu i inkubiraju 2 sata na 37 °C.

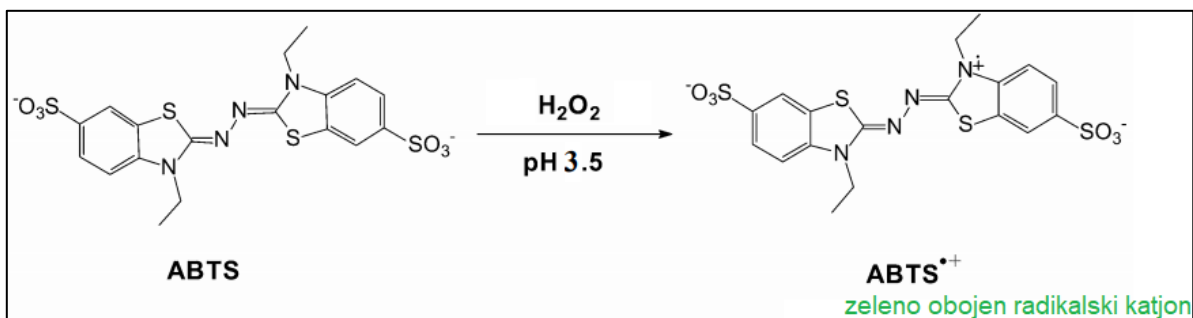
Svi uzorci se nanose na ELISA ploče pri čemu je za analizu neophodno nanijeti i slijepu probu (voda), uzorak čistog seruma i uzorak smješe seruma i TBH (u duplikatu) [138].

3.6.5. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)

Uzorcima u bazenčićima ELISA ploče se doda 200 µl reagensa 1 (acetatnog pufera), 12,5 µl seruma i 37,5 µl reagensa 2 (rastvor ABTS-a). Sadržaj ploče se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancije ispitivanih rastvora očitavaju se na ELISA čitaču, na talasnoj dužini od 660 nm uz rastvor ABTS-a kao slijepu probu.

Princip metode

Za određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS) korišćena je metoda koju je dao Erel, a optimizovala Kotur-Stevuljević [138, 139]. TAS se određuje spektrofotometrijskim mjerenjem, uz upotrebu stabilnog ABTS+ katjona kao hromogena [138]. U kiseloj sredini (acetatni pufer) ABTS molekul je oksidovan vodonik peroksidom do zeleno obojenog ABTS+ katjona. Antioksidansi prisutni u uzorku dovode do različitog stepena obezbojavanja, srazmjernog njihovoj koncentraciji, tj. antioksidativnom potencijalu uzorka (Slika 18).



Slika 18. Reakcija oksidacije ABTS

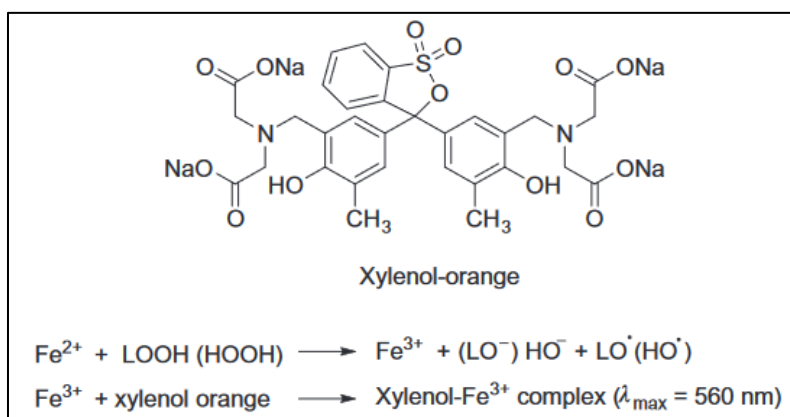
(Preuzeto i prilagođeno iz: Hernández-Rodríguez P, Baquero LP, Larrota HR. Chapter 14 - Flavonoids: Potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In: Campos MRS. (Ed.). Bioactive Compounds. Woodhead Publishing; 2019. p. 265-288)

3.6.6. Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS)

U reakcionu epruvetu se prenese 450 μl TOS 1 rastvora, doda se 22 μl rastvora TOS 2 i redom po 70 μl : seruma, standarda i dejonizovane vode. Sadržaj u epruvetama se promućka i inkubira 3 – 4 minuta, nakon čega se očitavaju apsorbance na talasnoj dužini od 560 nm.

Princip metode

Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS) se zasniva na činjenici da oksidansi iz uzorka (npr. vodonik peroksid i lipidni hidroperoksidi) oksiduju fero-ortodijanizidni kompleks (iz reagensa) u feri jon, u kiselj sredini, u prisustvu molekula glicerola (olakšava reakciju oksidacije). Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiselj sredini. Intenzitet boje rastvora proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku (Slika 19).



Slika 19. Oksidacija fero-ortodijanizidnog kompleksa u feri jon i građenje kompleksa sa ksilenol-oranžom

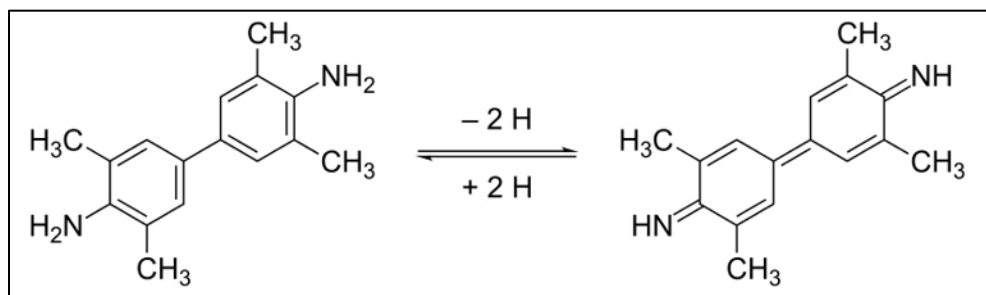
(Preuzeto i prilagođeno iz: Villamena FA. UV-Vis Absorption and Chemiluminescence Techniques. In: Reactive Species Detection in Biology. 1st ed. Elsevier; 2017. p. 203–251)

3.6.7. Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

U svaki od 96 bazenčića ploče se doda 10 μ l standardnog rastvora za određivanje PAB, 10 μ l destilovane vode i 180 μ l radnog rastvora za određivanje PAB. Ploča se inkubira 12 minuta na 37 °C, zaštićeno od svjetlosti. Reakcija se prekida dodavanjem 40 μ l 2 mM hlorovodonične kiseline. Apsorbancija rastvora se odmah očitava na ELISA čitaču na 450 nm. Vrijednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice) koje predstavljaju procenat vodonik peroksida u standardnim rastvorima pomnožen sa 6 (množenjem sa 6 dobijaju se cjelobrojne vrijednosti).

Princip metode

Za određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) korišćena je modifikovana Hamidi-Alamdari metoda [139]. Ovim testom se određuje koncentracija vodonik peroksida u antioksidativnom okruženju. Hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaguje i sa vodonik peroksidom i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vrijeme, s obzirom da se nalaze u istoj sredini. Enzim peroksidaza katalizuje reakciju vodonik peroksida i hromogena, pri čemu oksidacijom TMB-a nastaje intenzivno obojeni proizvod. S druge strane, reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana i u njoj se katjon redukuje čime se obezbojava cio proizvod. Intenziteti obojenja rastvora su srazmjerni odnosu dodatih količina vodonik peroksida i mokraćne kiseline (Slika 20).



Slika 20. Reakcija oksido-redukcije TMB

(Preuzeto i prilagođeno iz Wikipedia. [homepage on the Internet] Wikipedia; 2020 [cited 2020 Nov 24]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/3,3%27,5,5%27-Tetramethylbenzidine>)

3.6.8. Određivanje sadržaja sulfhidrilnih grupa (SHG)

U 900 μ l fosfatnog pufera pH 9,0 doda se 50 μ l uzoraka plazme i 200 μ l DTNB reagensa, miješa i inkubira 25 minuta na 25°C, zaštićeno od svjetlosti. Apsorbancija se očitava na 412 nm, u odnosu na slijepu probu.

Sadržaj SH grupa može se odrediti na dva načina:

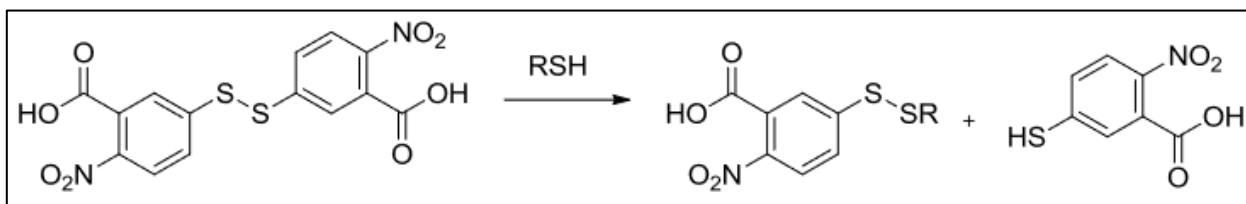
1. metodom kalibracione krive

Pripremljenim radnim razblaženjima redukovano glutationa (50 µl, opseg koncentracija od 0,1 do 1 mmol/l) doda se 200 µl DTNB reagensa i rastvori inkubiraju 25 minuta na 25°C, zaštićeno od svjetlosti. Apsorbancija se očitava na 412 nm, u odnosu na slijepu probu.

2. metodom molarnog apsorpcionog koeficijenta

Princip metode

Za određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa u serumu korišćena je modifikovana spektrofotometrijska Ellman-ova metoda. Metoda se zasniva na mjerenju apsorbcije žuto obojenog proizvoda koji nastaje u reakciji DTNB i alifatičnog tiolnog jedinjenja u baznoj sredini (pH = 9,0) (Slika 21).



Slika 21. Reakcija između DTNB i alifatičnog tiolnog jedinjenja

(Preuzeto i prilagođeno iz: Peng H, Chen W, Cheng Y, Hakuna L, Strongin R, Wang B. Thiol Reactive Probes and Chemosensors. *Sensors*. 2012;12(11):15907–15946)

3.6.9. Izračunavanje prooksidativnog, antioksidativnog i oksidativnog skora

Prooksidativni skor se dobija izračunavanjem srednje vrijednosti z-skorova prooksidativnih parametara (TOS i PAB), a antioksidativni kao srednja vrijednost z-skorova antioksidativnih parametara (TAS i SHG). Srednja vrijednost i Sd za računanje z-skora dobija se iz uzoraka slijepe probe u koje je u serum dodavana destilovana voda umjesto uzorka ispitivanog jedinjenja. Z-skor se računa prema obrascu (22):

$$(X-\mu)/\sigma \quad (22)$$

gdje je:

X - vrijednost određenog parametra redoks statusa;

µ - populaciona srednja vrijednost;

σ - populaciona standardna devijacija određena u serumima zdravih osoba.

Oksi skor predstavlja razliku vrijednosti prooksidativnog i antioksidativnog skora, i direktno opisuje redoks potencijal određenog jedinjenja. Veća vrijednost oksidativnog skora ukazuje da su prooksidansi u uzorku nadvladali antioksidanse i da je ispitivano jedinjenje slab antioksidans i suprotno.

3.6.10. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka korišćen je *SPSS 18.0* program (SPSS, INC. Chicago, Illinois SAD). Podaci su prikazani kao medijane i 25. i 75. percentil. U skladu sa tim je korišćen Kruskal-Wallisov test i njegov post-hoc test Mann-Whitney U test.

Pri ispitivanju i poređenju antioksidativne sposobnosti novosintetisanih jedinjenja, kao kriterijum za procjenu postojanja statistički značajne razlike, prihvaćen je kriterijum p (nivo značajnosti) $<0,001$.

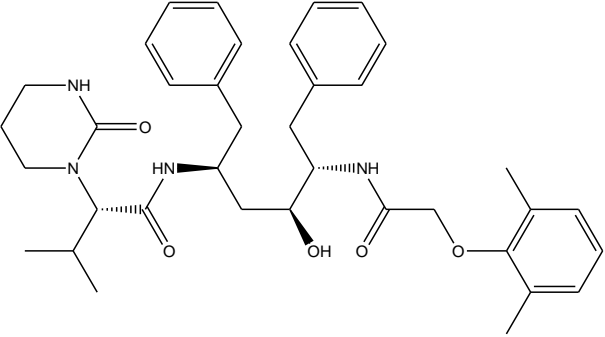
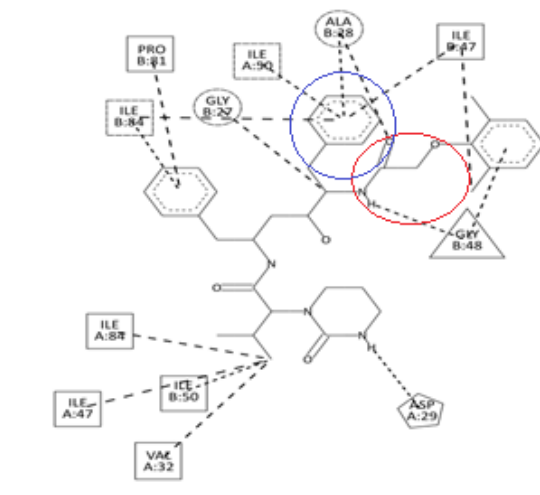
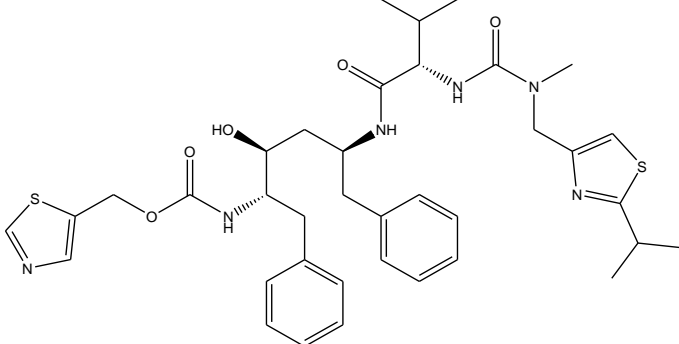
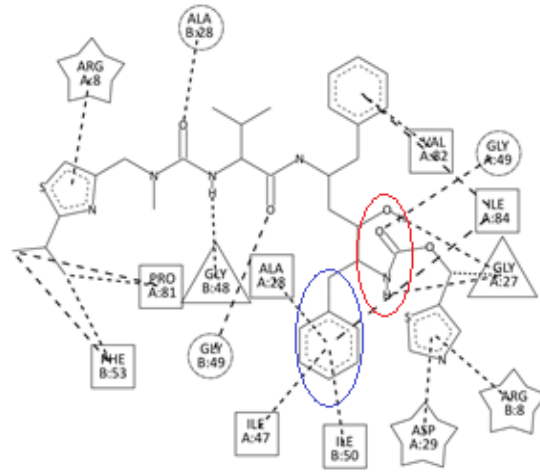
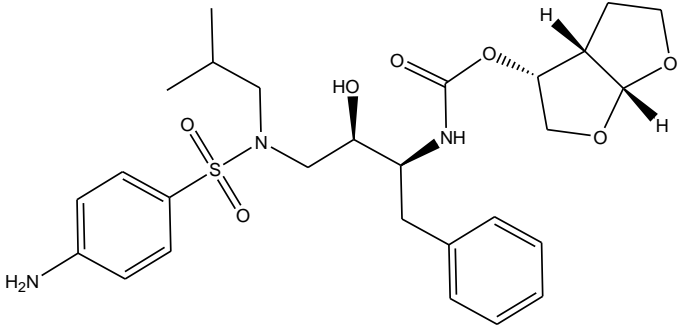
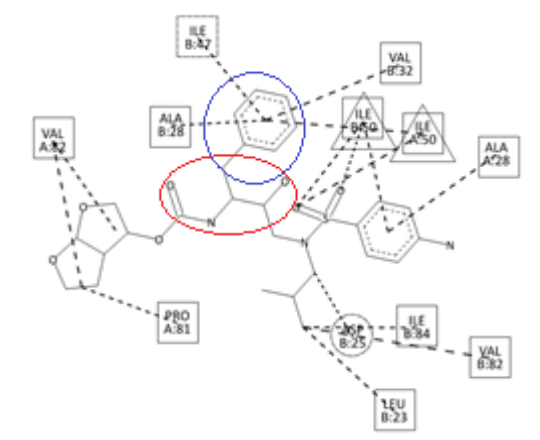
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija *docking*-a

4.1.1. *Docking* simulacija interakcija registrovanih inhibitora i osnovnih propiofenonskih struktura

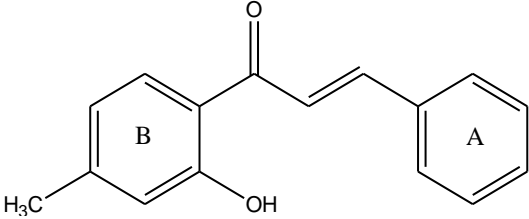
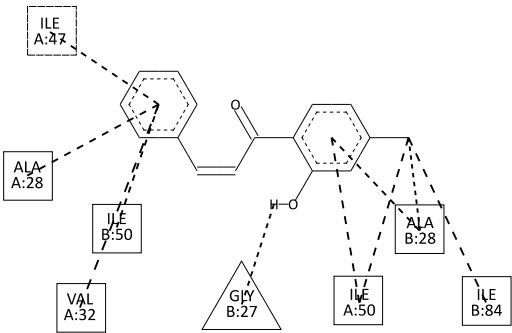
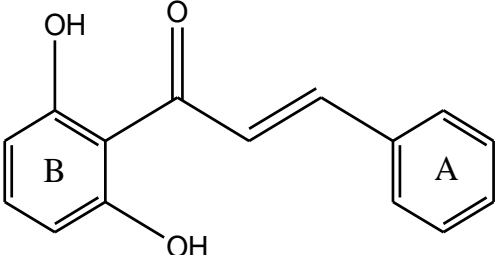
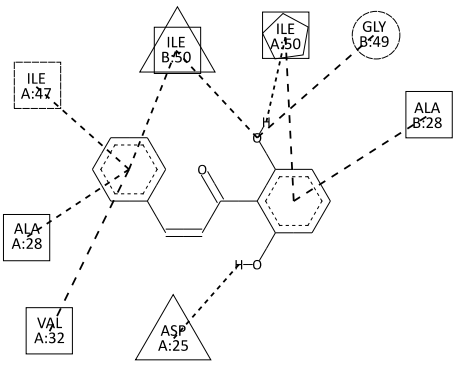
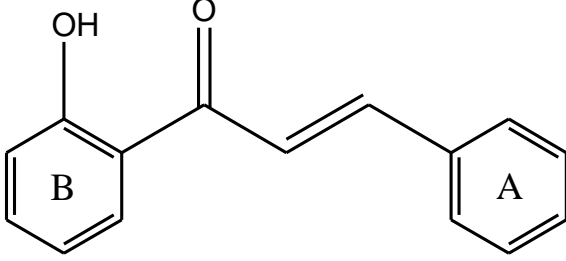
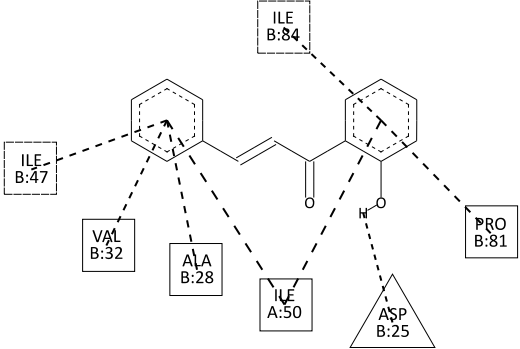
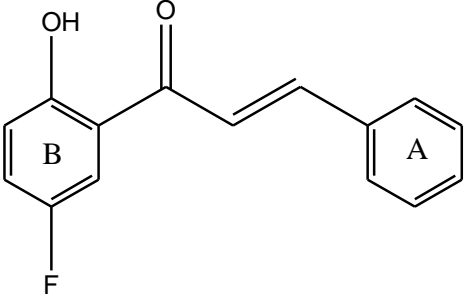
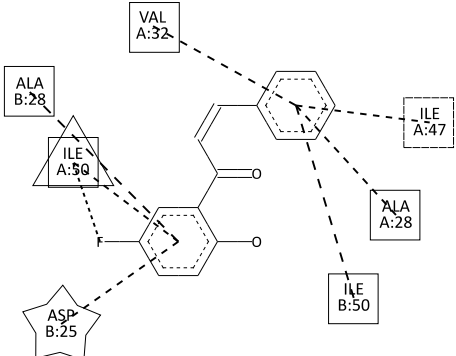
Primjenom kompjuterskog programa *AutoDock Vina* izvedeni su *docking* eksperimenti u 3D strukturi aktivnog mjesta HIV proteaze za optimizovane strukture registrovanih inhibitora, osnovne propiofenske strukture i derivate osnovnih propiofenonskih struktura. *Docking* eksperimenti su izvedeni pod pretpostavkom da osnovne propiofenonske strukture kao i njihovi derivati ostvaruju interakcije sa konzerviranom aminokiselinskom sekvencom Ala25Gly27Thr26 od značaja za hidrolitičku aktivnost enzima kao i aminokiselinskim sekvencama sa kojima registrovani inhibitori (lopinavir, ritonavir i darunavir) ostvaruju interakcije. Hemijske strukture, energije vezivanja, i najverovatnije konformacije i orijentacije kao i dominantne interakcije sa izdvojenim aminokiselinskim sekvencama prikazane su u tabelama 6 i 7.

Tabela 6. Hemijske strukture, energija vezivanja (E_v) i najpovoljnije konformacije registrovanih inhibitora HIV-1 proteaze

 <p>Lopinavir, $E_v = -10,20$ kcal/mol</p>	
 <p>Ritonavir, $E_v = -9,7$ kcal/mol</p>	
 <p>Darunavir, $E_v = -9,20$ kcal/mol</p>	

konvencionalna vodikna veza \triangle ; interakcija sa halogenom (fluor) \circ ; interakcija ugljenik vodik \curvearrowright ; pi-sigma \square ; alkil/pi-alkil \square ; nepovoljna donor-donor \diamond ; nepovoljna akceptor-akceptor \diamond ; pi-anjon \star ; amid-pi složena \curvearrowright ; pi-donor vodikna veza \triangleleft

Tabela 7. Hemijske strukture, energija vezivanja (E_v) i najpovoljnije konformacije osnovnih propiofenonskih struktura

 <p>Osnovna struktura I, $E_v = -8,40$ kcal/mol</p>	
 <p>Osnovna struktura II, $E_v = -8,20$ kcal/mol</p>	
 <p>Osnovna struktura III, $E_v = -7,90$ kcal/mol</p>	
 <p>Osnovna struktura IV, $E_v = -8,00$ kcal/mol</p>	

konvencionalna vodonična veza \triangle ; interakcija sa halogenom (fluor) \circ ; interakcija ugljenik vodonik \curvearrowright ; pi-sigma \square ; alkil/pi-alkil \square ; nepovoljna donator-donor \diamond ; nepovoljna akceptor-akceptor \square ; pi-anjon \star ; amid-pi složena \curvearrowright ; pi-donor vodonična veza \triangleleft

U strukturi registrovanih inhibitora, koji su iz grupe peptidnih inhibitora prisutan je hidroksi-etil-amino dio odgovoran za interakciju sa proteazom (Tabela 6). Za ovu *docking* studiju odabrane su propiofenonske strukture koje se strukturno razlikuju od registrovanih inhibitora, a razlozi za izbor ovakvih struktura bili su sledeći:

1. propiofenonska struktura može da posluži kao osnovna struktura za dizajn i sintezu nepeptidnih malih molekula, što je i cilj novih istraživanja na polju inhibitora HIV proteaze;
2. supstitucijom hidroksi-etil-amino grupe (dio strukture registrovanih inhibitora) propionskim mostom (dio strukture propiofenona) pruža se mogućnost za veći broj interakcija tipa vodoničnih veza u aktivnom mjestu proteaze, što je od značaja za potencijalno inhibitorno djelovanje, čak i na mutirane sojeve virusa [48, 49].

Preliminarnom *docking* simulacijom potvrđeno je da se sve četiri osnovne propiofenonske strukture (Tabela 7) vezuju u aktivnom mjestu enzima. Izdvojeno je nekoliko aminokiselinskih ostataka: Ile47, Ile 50, Ala28 i Val32 (Tabela 6) sa kojima benzilidenski dio (aromatični prsten A) ostvaruje zajedničke hidrofobne Pi-sigma, Pi-alkil i alkil-alkil interakcije kod sve četiri osnovne strukture kao i tri registrovana inhibitora (Tabela 7).

Za razliku od prstena A, koji je nesupstituisan, u položaju C2 prstena B sve četiri osnovne strukture (Tabela 7) prisutna je fenolna grupa za koju se u sprovedenim *docking* eksperimentima pokazalo da je od značaja za građenje vodonične veze sa aminokiselinama *konzervirane* aminokiselinske sekvence (AspA25-ThrA26-GlyA27, odnosno AspB25-ThrB26-GlyB27) aktivnog mjesta enzima [22]. Ključnu ulogu u hidrolizi Phe-Pro peptidne veze imaju AspA25 i AspB25 aminokiselinski ostaci sa kojima fenolna grupa strukture II i III gradi jaku vodoničnu vezu (Tabela 7). Uvođenje još jedne fenolne grupe u položaj C6 prstena B (osnovna struktura II), povećava se elektronska gustina, ali i volumen molekula, što utiče na formiranje dodatne vodonične veze u aktivnom mjestu sa nešto udaljenijim aminokiselinskim ostatkom IleB50 i značajnu stabilizaciju kompleksa molekul-enzim (Tabela 7). S druge strane, ukoliko se u prsten B pored fenolne uvede elektronegativna fluoro grupa, anjon-pi interakcija sa Asp25 *konzervirane* aminokiselinske sekvence se zadržava, a vodoničnu vezu sa IleA50 ostatkom gradi fluoro grupa. Ova promjena nastaje usljed smanjenja elektronske gustine (jak -I efekat fluora (Tabela 8)) na atomu kiseonika fenolne grupe i veće elektronegativnosti fluora. Ako se umjesto fluoro u prsten B uvede elektropozitivna, voluminoznija metil grupa (struktura I) interakcija (vodonična veza) sa AspA25 izostaje, a fenolna grupa vodoničnu vezu gradi sa nešto udaljenijom aminokiselinom *konzervirane* aminokiselinske sekvence GlyB27. Izostanak interakcije sa AspA25 objašnjava se time što metil grupa kao voluminoznija od vodonika i fluoro grupe mijenja geometriju (dužinu, volumen) molekula (Tabela 8).

4.1.2. *Docking* simulacija interakcija propiofenonskih derivata (halkona)

U skladu sa dobijenim rezultatima koji su zadovoljili početne ciljeve u sledećoj fazi *docking* studije ispitan je uticaj supstitucije u prstenu A na pozicioniranje (broj i tip interakcija) četiri osnovne propiofenonske strukture u aktivnom mjestu enzima. U *orto*, *meta* ili *para* položaje prstena A uvedene su grupe sa izrazito negativnim induktivnim (-I) (-fluoro i -trifluorometil), izrazito negativnim rezonantnim (-R) efektom (-nitro), grupe kod kojih su ovi efekti

umjerenog (-hloro, -metoksi) ili slabog (-metil) intenziteta (Tabela 8). Navedene grupe se razlikuju i po voluminoznosti (Tabela 8) što u zavisnosti od njihovog položaja u prstenu ima uticaja na pozicioniranje molekula u aktivnom mjestu enzima (Tabela 9).

Tabela 8. Elektronski i steri efekti grupa

supstituent	* σ_{meta}	* σ_{para}	* σ_I	Es
-H	0,00	0,000	0,00	0,00
-CF ₃	0,43	0,54	0,42	2,40
-CH ₃	-0,07	-0,17	0,04	1,24
-F	0,34	0,26	0,52	0,26
-Cl	0,37	0,23	0,47	0,97
OH	0,12	-0,37	0,29	0,55
OCH ₃	0,12	-0,27	0,27	1,74
NO ₂	0,71	0,78	0,76	2,52

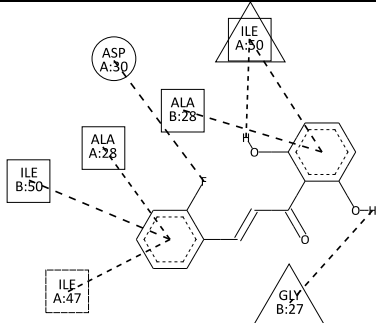
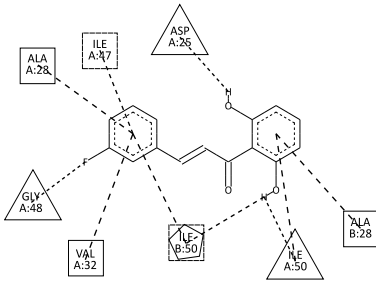
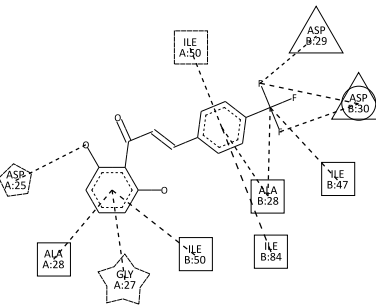
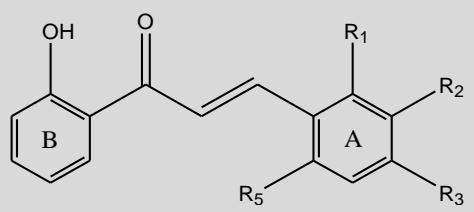
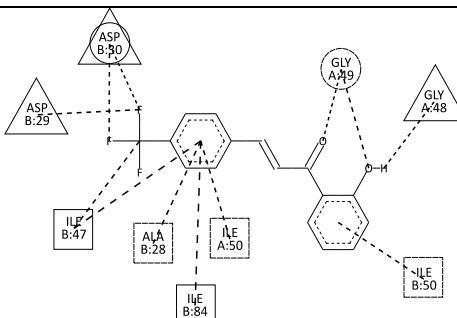
*podaci preuzeti iz Wired Chemist [homepage on the Internet] Claude Yoder; c2020 [cited 2020 Nov 27]. Available from: <http://www.wiredchemist.com/chemistry/data>

Rezultati eksperimenata prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Strukturne formule, energije vezivanja i najpovoljnije konformacije halkona

Osnovna struktura I				
Jedinjenje	R ₁	R ₃	Ev kcal/mol	Najpovoljnija konformacija
C2-21-Ch15	F	H	-8,7	

C3-23-Ch16	CF ₃	H			-8,6	
C8-22-Ch20	H	F			-8,5	
C9-54-Ch21	CH ₃	F			-8,4	
<p>Osnovna struktura II</p>						
Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Ev kcal/mol	Najpovoljnija konformacija
C1-42-Ch14	F	CF ₃	H	H	-8,8	

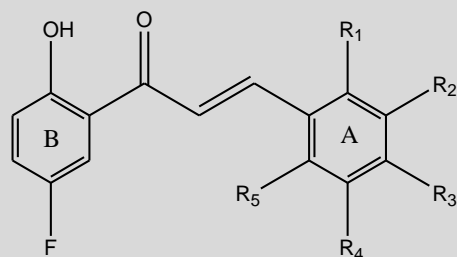
C4-27-Ch17	F	H	H	H	-8,5	
C5-32-Ch18	H	F	H	H	-8,5	
C10-26-Ch22	H	H	CF ₃	H	-8,4	
<p>Osnovna struktura III</p> 						
Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	Ev kcal/mol	Najpovoljnija konformacija
C6-48-Ch4	H	H	CF ₃	H	-8,5	

62-Ch10	H	CH ₃	H	H	-8,4	
C11-51-Ch9	CH ₃	H	H	H	-8,3	
C13-52-Ch6	CH ₃	H	F	H	-8,3	
C15-Ch1	F	H	H	H	-8,2	
Ch3	CF ₃	H	H	H	-8,2	

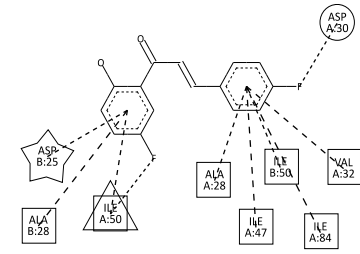
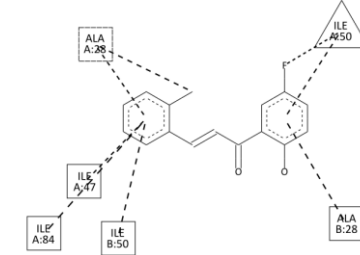
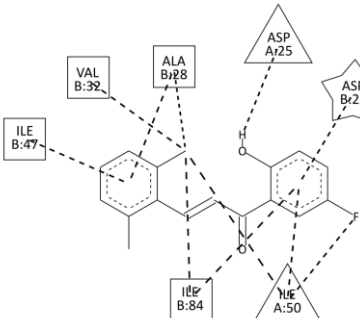
C17-63-Ch7	OCH ₃	H	H	H	-8,1	
C18-Ch5	Cl	H	H	H	-8,1	
C20-46-Ch27	Cl	H	H	Cl	-8,0	
C22-13-Ch29	Cl	H	Cl	H	-8,0	
C24-47	H	H	H	H	-7,9	

65-Ch2	H	H	F	H	-7,9	
66-Ch11	H	H	CH ₃	H	-7,9	
Ch13	H	NO ₂	H	H	-7,9	
Ch12	NO ₂	H	H	H	-7,7	
Ch8	OCH ₃	H	H	OCH ₃	-7,6	

Osnovna struktura IV



Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Ev kcal/mol	Najpovoljnija konformacija
C7-20-Ch19	CF ₃	H	H	H	H	-8,5	
C12-17-Ch23	F	H	H	H	H	-8,3	
C14-18-Ch24	H	F	H	H	H	-8,3	
C16-14-Ch25	Cl	H	Cl	H	H	-8,2	

C19-19-Ch26	H	H	F	H	H	-8,1	
C21-16-Ch28	Cl	H	H	H	H	-8,0	
C25-12-Ch30	Cl	H	H	H	Cl	-7,9	

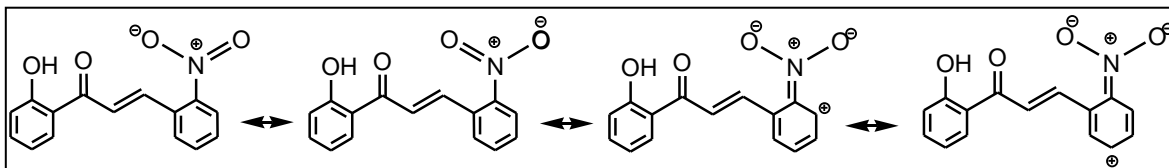
konvencionalna vodonična veza \triangle ; interakcija sa halogenom (fluor) \circ ; interakcija ugljenik vodonik \curvearrowright ; pi-sigma \square ; alkil/pi-alkil \square ; nepovoljna donor-donor ∇ ; nepovoljna akceptor-akceptor ∇ ; pi-anjon \star ; amid-pi složena ∇ ; pi-donor vodonična veza \triangle

Ako se izvrši sveobuhvatna analiza eksperimenata koji su sprovedeni sa derivatima sve četiri osnovne strukture uočava se da uvođenjem grupe sa jakim -I efektom (-CF₃, -F) u prsten A povoljno utiče na formiranje dodatnih interakcija molekula u aktivnom mjestu enzima (derivati C1-42-Ch14, C3-23-Ch16, C6-48-Ch4 i C7-20-Ch19). Grupe sa jakim -R efektom (-NO₂) smanjuju elektronsku gustinu u prstenovima A i B što nepovoljno utiče na formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mjestu enzima (Ch12 i Ch13 (Tabela 9)).

Kao struktura od koje su izvedene preostale tri osnovne strukture, struktura III je poslužila za dizajniranje najvećeg broja derivata. Sprovedeni su *docking* eksperimenti u cilju ispitivanja uticaja sternih i elektronskih efekata uvedenih supstituenata na pozicioniranje i interakcije molekula u aktivnom mjestu enzima.

U prsten A strukture III uvođeni su u različite položaje (*orto*, *meta*, *para*) supstituenti sa različitim elektronskim i sternim efektima: -CF₃, -CH₃, -F, -Cl, -OCH₃, -NO₂ (Tabela 8). Supstitucijom vodonikovog atoma na položaju C2 prstena A neznatno voluminoznijom (E_s=0,26) ali daleko elektronegativnijom -F grupom (Tabela 8) ostvaruje se dodatna, jaka halogen inerakcija sa aminokiselinskim ostatkom AspA30 (C15-Ch1). Da -F grupa u prstenu A ne utiče na formiranje interakcije sa aminokiselinskim ostatkom AspA30, potvrđeno je u eksperimentu koji je sproveden sa derivatom kod koga je u položaj C4 prstena A uvedena -

F grupa (65-Ch2). Dobijen je isti rezultat kao u predhodnom eksperimentu što navodi na zaključak da prisustvo -F, kao izrazito elektronegativne grupe bez obzira na položaj, povoljno utiče na interakciju molekula u aktivnom mjestu enzima. Nakon toga uslijedili su *docking* eksperimenti sa derivatima koji umjesto -F u svojoj strukturi imaju elektronegativnu -NO₂ grupu sa -I i -R efektima (Ch12 i Ch13). Jakim -R efektom -NO₂ grupa smanjuje elektronsku gustinu u prstenovima A i B što za posljedicu ima građenje stabilnog konjugovanog sistema u strukturama Ch12 i Ch13 (Slika 22). Ovakav raspored naelektrisanja unutar molekula nepovoljno utiče na formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mjestu enzima.



Slika 22. Rezonantna stabilizacija nitroderivata

Sprovedeni eksperimenti navode na zaključak da elektronegativna grupa mora imati -I efekat. Uslijedio je set eksperimenata sa derivatima koji umjesto -F sadrže voluminozniju i manje elektronegativnu (Tabela 8) -Cl grupu (C18-Ch5, C20-46-Ch27, C22-13-Ch29). Rezultati prikazani u tabeli 9 ukazuju da prisustvo -Cl grupe povoljno utiče na pozicioniranje molekula u aktivnom mjestu, ali samo u slučaju *orto* disupstitucije. Elektronski efekat -Cl grupe je slabiji, sterna daleko veći od -F (Tabela 8) što kod monosupstituisanog derivata nepovoljno utiče na formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mjestu. Disupstitucijom prstena A -Cl grupama uticaj elektronskog efekta raste, što za posljedicu ima formiranje dodatnih interakcija derivata C20-46-Ch27 i C22-13-Ch29 u aktivnom mjestu enzima i AspB25 *konzervirane* aminokiselinske sekvence. Sa elektronskim efektom raste i sterna efekat ali očigledno da je njegov uticaj u ovom slučaju manji. Eksperimenti sa hlora derivatima su doveli do novog zaključka: pozitivan uticaj na pozicioniranje i interakcije derivata imaju modifikacije prstena A grupama sa jakim -I efektom koje su ujedno i voluminozne. Kako navedene karakteristike ima -CF₃ grupa (Tabela 8) novi set eksperimenata sproveden je sa derivatom C6-48-Ch4 kod koga je prsten A modifikovan trifluorometil grupom. Prisustvo -CF₃ grupe utiče na formiranje dodatne halogene interakcije fluora sa ostatkom AspA30 i vodonične veze sa aminokiselinskim ostatkom AspB29, što čini kompleks enzim-jedinjenje izuzetno stabilnim.

Uticaj samog sternog efekta na pozicioniranje molekula u aktivnom mjestu enzima ispitan je u eksperimentima koji su sprovedeni sa derivatima koji u prstenu A sadrže voluminozne, elektroneutralne metil grupe (62-Ch10, C11-51-Ch11, C13-52-Ch6). Prisustvo metil grupe povećava zapreminu molekula (Tabela 8) i time mijenja njegov položaj u aktivnom mjestu. Derivati se pozicioniraju tako da u odnosu na osnovnu strukturu formiraju dodatne Pi-alkil interakcije sa aminokiselinskim ostacima AlaB28 i IleB84.

Uticaj sternog efekta grupe na pozicioniranje derivata osnovne strukture III je pozitivan, ali je njegov doprinos daleko manji u poređenju sa elektronskim efektima.

Eksperimenti sprovedeni sa fluoriranim derivatima osnovne strukture I potvrdili su rezultate prethodnih eksperimenata sa fluoriranim derivatima osnovne strukture III (Tabela 9). Fluoro

grupa u *orto* ili *para* položajima prstena A formira jaku halogen interakciju sa aminokiselinskim ostakom AspA30 bez obzira na pozicioniranje. Ako se u derivat C8-22-Ch20 sa fluoro grupom uvede metil grupa ($E_s=1,24$) voluminoznost molekula se mijenja, ali ovaka promjena nema uticaja na građenje dodatnih interakcija u aktivnom mjestu enzima (C9-54-Ch21). Međutim, ukoliko se *orto* pozicionirani vodonik prstena A supstituiše voluminoznom trifluorometil grupom ($E_s=2,40$) kao i u prethodnim eksperimentima (derivati strukture III) formira se jaka halogen interakcija dva od tri atoma fluora sa aminokiselinskim ostatkom GlyA27 *konzervirane* aminokiselinske sekvence što povoljno utiče na pozicioniranje molekula u aktivnom mjestu. Zaključak koji je uslijedio nakon eksperimenata sa derivatima osnovne strukture identičan je zaključku koji je izveden nakon eksperimenata sa derivatima osnovne strukture III: elektronski efekti dominiraju u odnosu na sterne.

U eksperimentima sprovedenim sa derivatima osnovnih struktura II i IV supstitucija vodonikovih atoma prstena A grupama sa -I efektom (-F) (C4-27-Ch17, C5-32-Ch18, C12-17-Ch23, C14-18-Ch24) i voluminoznim grupama sa -I efektom (-CF₃) (C7-20-Ch19, C10-26-Ch22) dobijeni su isti rezultati. Derivat C1-42-Ch14 koji u *orto* položaju prstena A sadrži -F, a u *meta* -CF₃ grupu u poređenju sa osnovnom strukturom II formira veći broj dodatnih interakcija i to: halogen interakcije sa GlyA27 iz *konzervirane* aminokiselinske sekvence, GlyA38 i AspA30 i dodatna vodonična veza sa AspA29 (Tabela 9). Eksperimenti sprovedeni sa hloro derivatima strukture IV (C16-14-Ch25, C21-16-Ch28 i C25-12-Ch30) dali su slične rezultate kao i eksperimenti sa hloro derivatima strukture III.

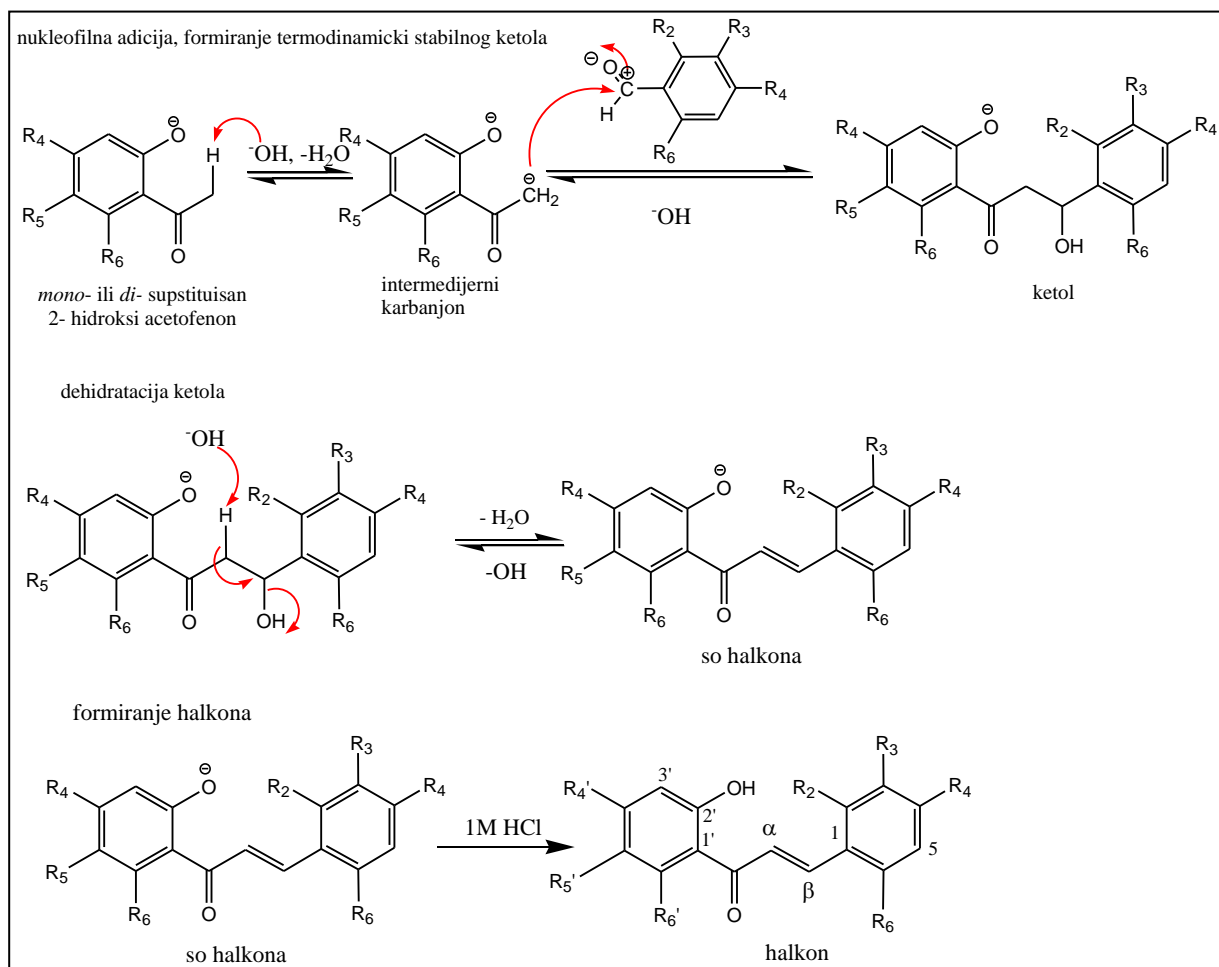
Analizom sprovedenih *docking* studija može se zaključiti da elektronski efekti supstituenata na benzenovim prstenovima A i B osnovne 1,3-difenil propenonske strukture doprinose formiranju dodatnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu enzima i stabilizaciji kompleksa halkan-enzim i to:

1. *orto* disupstitucija prstena B fenolnim grupama kao proton akceptorskim grupama, koje grade vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta, a to ide u prilog podatku da povećanje broja vodoničnih veza smanjuje mogućnost mutacija virusa [48, 49].
2. supstitucija prstena A grupama sa jakim -I efektom (-F) kao i voluminoznim grupama sa jakim -I efektom (-CF₃) u velikoj mjeri doprinosi formiranju halogen interakcija i vodoničnih veza.

4.2. Rezultati i diskusija sinteze

4.2.1. Sinteza halkona

Na osnovu sprovedenih *docking* eksperimenata, a u cilju daljih bioloških ispitivanja izvršena je sinteza 17 novih mono- ili di- supstituisanih halkona reakcijom bazno katalizovane aldolne kondenzacije (Slika 23).



Slika 23. Mehanizam bazno katalizovane aldolne kondenzacije

U prisustvu baze kiseli α -H atom metil grupe mono- ili di- supstituisanog 2-hidroksiacetofenona *odlazi* u obliku molekula vode i nastaje intermedijarni karbanjon (enolati anjon) koji kao nukleofil reaguje sa elektropozitivnim ugljenikovim atomom aldehidne grupe mono- ili di- supstituisanog benzaldehida i gradi termodinamički stabilan ketol. Termodinamička stabilnost nastalog ketola u direktnoj je vezi sa strukturom i osobinama (sternim i elektronskim) supstituenata na benzenovim prstenovima. Supstituenti koji utiču na povećanje kiselosti H atoma ketola, utićaće istovremeno i na pomijeranje

ravnotežnog procesa u desno, ka nastajanju α , β -nezasićenog ketona (soli halkona). Supstituenti koji smanjuju kiselost, imaju suprotan efekat. Dakle, reakcija nastajanja ketola kao i reakcija dehidratacije ketola su ravnotežni procesi.

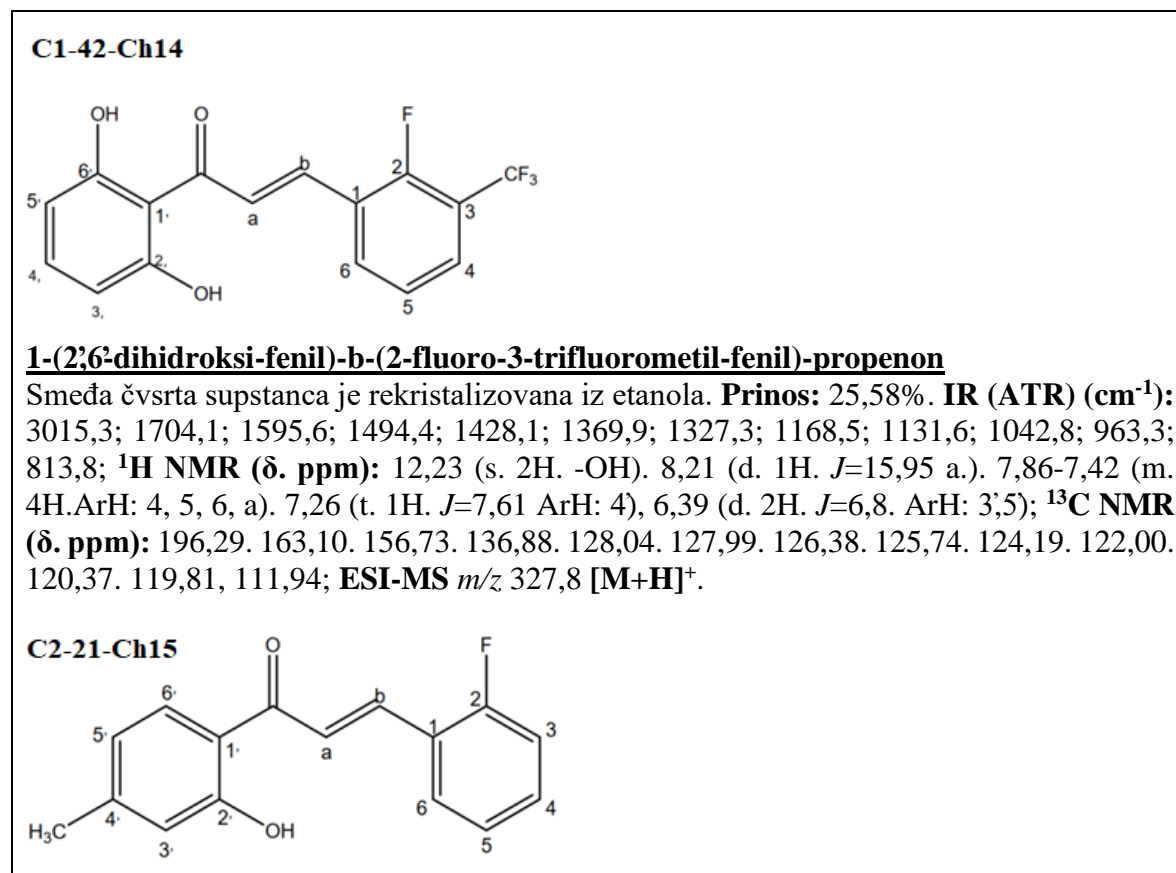
Zbog prisustva fenolne grupe u strukturi mono- ili di- supstituisanog 2-hidroksiacetofenona nastali α , β -nezasićeni keton se nalazi u obliku fenolatnog anjona iz koga se dodatkom 1 M HCl prevodi u molekulski oblik fenola, halkon.

Ketol u manjem ili većem procentu zaostaje u reakcionoj smješi kao nečistoća i iz nje se uklanja preparativnom hromatografijom.

U bazno katalizovanoj reakciji aldolne kondenzacije koja se odvija na sobnoj temperaturi u vodeno-etanolnom rastvoru, kao proizvod nastaje samo *trans* izomer α , β -nezasićenog ketona, što je potvrđeno hromatografskim i spektroskopskim metodama ($^1\text{H NMR } J_{\text{vinil H}} = 15,2-15,6$). Enonska struktura u molekulu halkona (Slika 23) koja povezuje dva benzenova prstena predstavlja kombinovanu hromoforu koja uslovljava batohromno pomijeranje apsorpcionih maksimuma benzena prema vidljivoj oblasti spektra te su dobijeni halkoni obojeni proizvodi.

4.2.2. Strukturna analiza sintetisanih jedinjenja

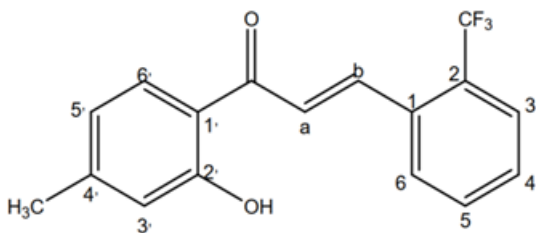
Nakon prečišćavanja izvršena je strukturna analiza sintetisanih jedinjenja IC, NMR i MS-MS spektroskopijom (Slika 24):



b-(2-Fluoro-fenil)-1-(2-hidroksi-4-metil-fenil)-propenon

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 85,26%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3015,4; 1644,3; 1573,6; 1504,7; 1366,9; 1227,9; 1210,7; 1146,6; 980,4; 828,6; 789,4; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,82 (s. 1H. -OH). 8,00 (d. 1H. *J*=15,91 a.). 7,96 (d. 1H.ArH: 6), 7,30-7,86 (m. 4H. ArH:3, 4, 6; b); 2,38 (s.3H CH₃); **¹³C NMR (δ. ppm):** 193,86. 161,33. 144,60. 138,37. 135,56. 128,97. 127,37. 126,12. 125,75. 122,99. 121,57. 120,80, 119,02; **ESI-MS *m/z* 257,2 [M+H]⁺.**

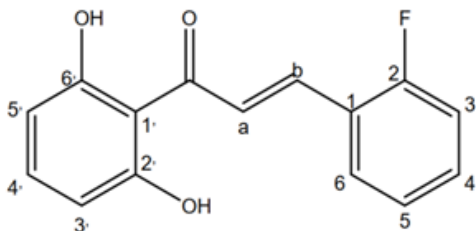
C3-23-Ch16



1-(2²Hidroksi-4²metil-fenil)-b-(2-trifluorometil-fenil)-propenon

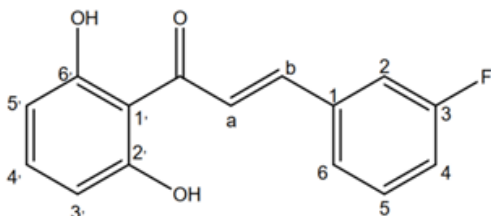
Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 87,16%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1640,9; 1582,2; 1573,5; 1363,2; 1310,2; 1287,1; 1157,4; 1100,5; 1037,4; 971,6; 804,6; 761,1; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,69 (s. 1H. -OH). 8,26 (d. 1H. *J*=15,94 b.). 8,21-7,74 (m. 4H.ArH: 6, 3, 4; a), 7,64-7,50 (m. 2H. ArH: 5, 6; b), 6,85-6,75(m. 2H.ArH: 5', 3') 2,38 (s.3H CH₃); **¹³C NMR (δ. ppm):** 192,64. 163,91. 148,52. 140,22. 132,10. 129,65. 128,05. 126,41. 124,75. 118,80; **ESI-MS *m/z* 307,1 [M+H]⁺.**

C4-27-Ch17

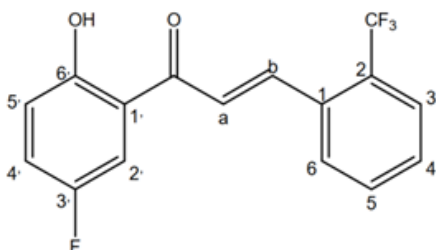


1-(2,6-Dihidroksi-fenil)-b-(2-fluoro-fenil)-propenon

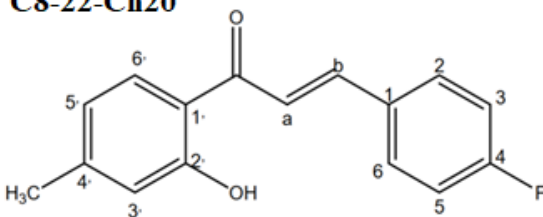
Smeđa čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 30,52%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3015,3; 1713,5; 1615,3; 1489,3; 1437,7; 1226,0; 1092,5; 756,5; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,23 (s. 2H. -OH). 8,19 (d. 1H. *J*=15,92 b.). 7,85-7,59 (m. 3H.ArH: 4, 6, a), 7,35-7,26 (m. 3H. ArH: 3, 4', 5), 6,39 (d. 2H. *J*=6,8. ArH: 3', 5'); **¹³C NMR (δ. ppm):** 196,29. 163,10. 160,73. 158,76. 136,76. 135,82. 133,39. 129,86. 125,76. 122,93. 116,30. 111,94, 108,56; **ESI-MS *m/z* 259,1 [M+H]⁺.**

C5-32-Ch18**1-(2,6-Dihidroksi-fenil)-b-(3-fluoro-fenil)-propenon**

Smeđa čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 44,52%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1613,4; 1588,7; 1437,3; 1367,0; 1226,1; 1134,1; 1101,5; 783,1; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,31 (s. 2H. -OH). 7,91-7,83 (m. 3H.ArH: 2, 6, a). 7,79 (d. 1H. *J*=15,90 b.). 7,66 (m. 1H. ArH:5), 7,69 (m. 2H. ArH: 4,4); 6,70 (d 2H. *J*=6,80 ArH:3', 5') **¹³C NMR (δ. ppm):** 196,22. 164,41. 163,10. 162,44. 144,61. 137,62. 131,00. 125,67. 124,22. 118,35. 114,91. 111,75. 108,56; **ESI-MS *m/z*** 258,9 [M+H]⁺.

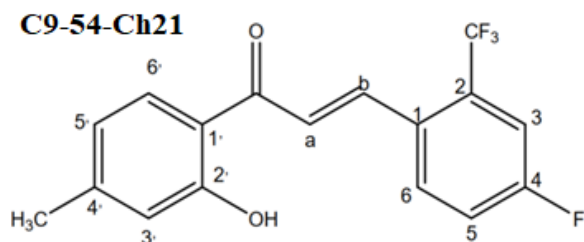
C7-20-Ch19**1-(3-Fluoro-6-hidroksi-fenil)-b-(2-trifluorometil-fenil)-propenon**

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 85,06%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1644,3; 1586,8; 1574,6; 1484,1; 1351,8; 1286,4; 1238,9; 1099,8; 1061,1; 1034,7; 1015,6; 970,9; 850,8; 771,4; 757,5; 719,2; 680,3; 651,1; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,50 (s. 1H. -OH). 8,31 (d. 1H. *J*=15,96 b). 7,96-7,56 (m. 3H.ArH: 3, 4, a). 7,39-7,21 (m 4H. ArH: 5, 6, 4', 2'). 6,90 (q. 1H. *J*=8. ArH: 5); **¹³C NMR (δ. ppm):** 193,10. 159,51. 157,53. 156,82. 138,37. 135,56. 131,57. 128,97. 127,37. 126,12. 125,18. 122,99. 121,87. 120,80. 119,53. 117,60; **ESI-MS *m/z*** 311,1 [M+H]⁺.

C8-22-Ch20**b-(4-Fluoro-fenil)-1-(2-hidroksi-4-metil-fenil)-propenon**

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 85,26%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1633,8; 1568,4; 1502,6; 1352,9; 1208,2; 1192,7; 1099,8; 975,8; 849,2; 831,7; 979,2

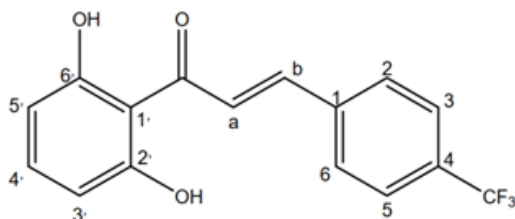
¹H NMR (δ, ppm): 12,84 (s. 1H. -OH). 7,89 (d. 1H. *J*=15,91 b.). 7,79-7,67 (m. 3H.ArH: 2, 6; a), 7,66-7,64 (m. 2H. ArH:3,5); 7,57 (s. 1H. ArH:3); 7,15-7,13 (m. 1H. ArH:6); 6,84-6,75 (m. 1H. ArH:5); 2,38 (s.3H CH₃); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,86. 164,22. 162,25. 161,33. 144,60. 132,28. 130,25. 129,66. 125,75. 119,02. 118,407. 114,82. 21,52; **ESI-MS** *m/z* 256,9.



1-(2-Hidroksi-4-metil-fenil)-3-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-propenon

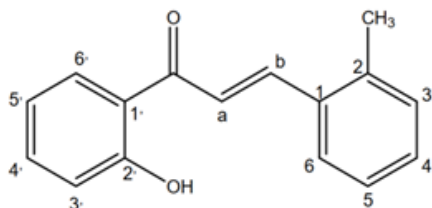
Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 93,15%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3015,3; 1640,7; 1573,2; 1504,2; 1493,9; 1365,5; 1286,9; 1234,9; 1208,3; 1167,9; 1146,06; 975,9; 955,7; 943,8; 849,7; 784,2; 735,1; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,79 (s, 1H, -OH), 7,92 (d, 1H, *J*=16, ArH: b), 7,7-7,54 (m, 2H, ArH: 6,a), 7,39-6,97 (m, 2H, ArH: 3,5), 7,26 (s, 1H, ArH: 3), 6,98-6,93 (m, 2H,ArH:3', 5'), 2,50(s, 3H, - CH₃); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,80, 162,19, 161,33, 160,22, 144,60, 138,37, 132,70, 131,97, 130,75, 129,66, 127,36, 125,75, 122,98, 121,57, 120,78, 118,40, 117,04; 115,14; 114,95; 21,52; **ESI-MS** *m/z* 270,8.

C10-26Ch22

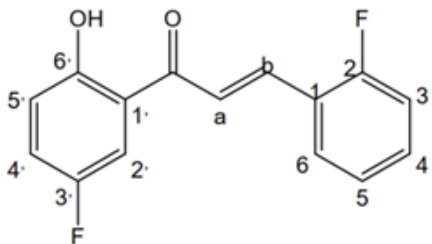


1-(2,6-Dihidroksi-fenil)-3-(4-trifluorometil-fenil)-propenon

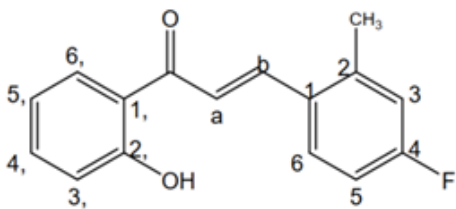
Žuta do smeđa čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 75,50%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1698,1; 1619,2; 1323,3; 1286,8; 1253,5; 1230,9; 1166,3; 1111,2; 1066,4; 1018,3; 850,4; 779,5; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,23 (s. 2H. -OH). 8,21 (d. 1H. *J*=15,95 b.). 7,86-7,42 (m. 5H.ArH: 3, 5, 6, 2; a), 7,21 (t. 1H. *J*=7,61 ArH: 2), 6,42 (d. 2H. *J*=6,8. ArH: 3',5); **¹³C NMR (δ, ppm):** 196,22. 163,10. 143,42. 136,76. 135,88. 130,90. 128,40. 127,61. 125,77. 122,86. 120,69. 111,75, 108,56; **ESI-MS** *m/z* 309,0 [M+H]⁺.

C11-51-Ch9**1-(2'-Hidroksi-fenil)-3-o-tolil-propenon**

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 90,50%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3015,3; 1636,5; 1575,5; 1258,2; 2919,4; 1481,6; 1320,8; 1195,9; 1155,2; 1016,2; 865,1; 805,2; 819; 741,2; 661,1; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,84 (s, 1H, -OH), 8,27 (d, 1H, *J* = 15,60, b), 7,94 (dd, 1H, *J*₁ = 8,20, *J*₂ = 1,40, ArH 6'), 7,73-7,56 (m, 3H, a, *J* = 15,2, a, ArH: 4', 6), 7,38-7,23 (m, 3H, ArH: 3, 4, 5), 7,05-7,69 (m, 2H, ArH: 3', 5'), 2,50 (s, 3H, - CH₃); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,80, 163,65, 143,07, 138,65, 136,39, 133,63, 131,04, 130,66, 129,69, 126,54, 126,42, 120,02, 121,19, 120,02, 118,86, 118,62, 19,81; **ESIMS *m/z*** 239,3 [M+H]⁺.

C12-17-Ch23**1-(3'-Fluoro-6'-hidroksi-fenil)-b-(2-fluoro-fenil)-propenon**

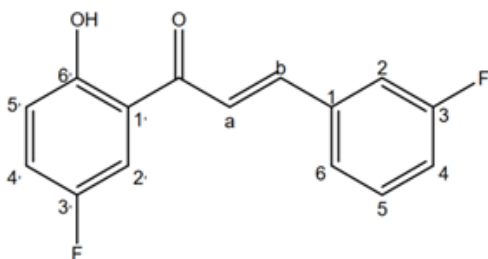
Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 88,16%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1641,4; 1575,1; 1482,6; 1418,7; 1345,7; 1279,9; 1262,5; 1248,8; 1201,1; 1148,2; 1173,9; 1020,1; 942,7; 860,3; 822,5; 783,3; 679,5; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,50 (s, 1H, - OH), 8,04 (d, 1H, *J*=15,96 b), 7,69-7,64 (m, 3H, ArH: 6, 4, a), 7,59-7,56 (m, 2H, ArH: 5, 3), 7,44-7,42 (m, 1H, ArH: 2); 7,28-6,99 (m, 2H, ArH: 2', 4'); **¹³C NMR (δ, ppm):** 192,96, 163,25, 160,71, 159,72, 156,08, 153,71, 139,18, 132,59, 130,39, 124,70, 123,97, 122,62, 119,94, 116,60, 114,74; **ESI-MS *m/z*** 260,8.

C13-52-Ch6

3-(4-Fluoro-2-metil-fenil)-1-(2³hidroksi-fenil)-propenon

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 93,15%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3015,3; 1638,1; 1568,9; 1486,6; 1252,9; 1481,6; 1341,3; 1298,1; 1201,7; 1175,2; 1152,8; 1022,3; 954,1; 852,7; 749,2; 711,0; 661,2; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,27 (s. 1H. -OH). 7,92 (d. 1H. *J*=8. ArH: 6). 7,71 (d. 1H. *J*=8. ArH: 4). 7,54 (d. 1H. *J*=16. a). 7,26 (s. 1H. ArH: 3). 7,05 (d. 1H. *J*=8. ArH: 6). 6,98-6,93 (m. 4H.ArH:3. 3. 5'. 5). 2,34 (s. 3H. -CH₃); **¹³C NMR (δ. ppm):** 205,31. 162,53. 138,10. 136,42. 134,41. 130,05. 129,97. 129,75. 128,55. 119,26. 118,95. 117,09. 116,88. 112,87. 112,67. 19,96; **ESI-MS *m/z*** 257,1 [**M+H**]⁺.

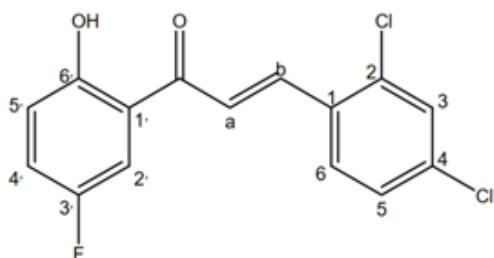
C14-18-Ch24



1-(3³Fluoro-6³hidroksi-fenil)-b-(3-fluoro-fenil)-propenon

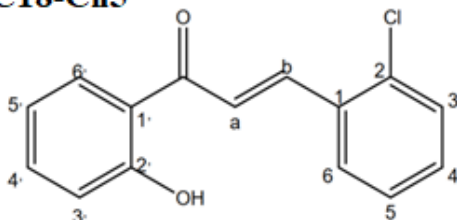
Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 73,59%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1645,5; 1582,4; 1481,3; 1450,1; 1423,5; 1283,1; 1240,7; 1223,5; 1201,2; 1158,9; 1174,5; 1025,4; 1002,9; 972,3; 846,8; 824,0; 781,3; 733,2; 691,6; 676,8; 665,5; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,43 (s. 1H. -OH). 7,71 (d. 1H. *J*=16. b) 7,58-7,55 (m. 1H. ArH: 6). 7,39-7,35 (m. 4H.ArH: 2,5,2' a). 7,25 (m 1H. ArH:4). 7,21 (m. 1H. ArH: 4); 6,95 (m. 1H. ArH: 5); **¹³C NMR (δ. ppm):** 192,96. 163,25. 160,71. 159,72. 156,08. 153,71. 139,18. 132,59. 130,39. 124,70. 123,97. 122,62. 119,94. 116,60. 114,74; **ESI-MS *m/z*** 260,9.

C16-14-Ch25

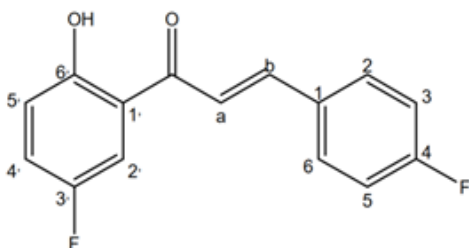


b-(2,4-Dihloro-fenil)-1-(3³fluoro-6³hidroksi-fenil)-propenon

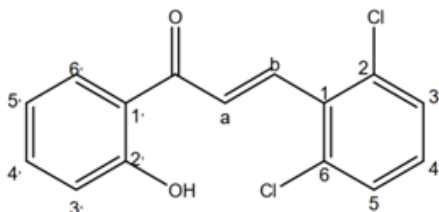
Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 62,49%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1645,1; 1578,9; 1478,9; 1355,4; 1240,9; 1170,0; 972,3; 850,5; 835,5; 784,1; 722,1; 677,2; **¹H NMR (δ. ppm):** 12,43 (s. 1H. -OH). 7,91 (d. 1H. *J*=15,95 b) 7,78-7,62 (m. 2H. ArH: 3, 6). 7,51 (m. 1H.ArH: 5). 7,45 (d 1H. *J*=15,88 a). 7,21 (m. 1H. ArH: 2); 7,19 (m. 1H. ArH: 4); 6,99 (m. 1H. ArH: 5); **¹³C NMR (δ. ppm):** 193,10. 159,51. 157,53. 156,82. 137,88. 135,52. 134,83. 132,13. 129,85. 128,65. 127,91. 122,93. 121,87. 119,53. 117,60; **ESI-MS *m/z*** 311,8.

C18-Ch5**b-(2-Hloro-fenil)-1-(2'-hidroksi-fenil)-propenon**

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 82,58%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1637,8; 1574,3; 1203,4; 1019,9; 1484,6; 1439,9; 1338,9; 1152,7; 973,6; 745,3; 658,4; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,75 (s, 1H, -OH), 8,34 (d, 1H, *J* = 15,17, b), 7,93 (dd, 1H, *J*₁ = 7,76, *J*₂ = 1,68, ArH 6'), 7,79-7,74 (m, 1H, ArH 4'), 7,67 (d, 1H, *J* = 15,73, a), 7,55-7,42 (m, 2H, ArH: 3, 6), 7,39-7,26 (m, 2H, ArH: 4, 5), 7,05-6,90 (m, 2H, ArH: 3', 5'); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,49. 163,63. 141,14. 136,59. 135,72. 132,88. 131,53. 130,40. 129,71. 127,89. 127,13. 122,65. 119,84. 118,91. 118,66; **ESI-MS** *m/z* 258,9.

C19-19-Ch26**1-(3'-Fluoro-6'-hidroksi-fenil)-b-(4-fluoro-fenil)-propenon**

Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 78,59%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1646,2; 1578,9; 1510,5; 1482,7; 1421,6; 1354,5; 1302,6; 1269,5; 1248,8; 1230,6; 1206,5; 1166,2; 1022,6; 978,8; 944,6; 829,8; 816,1; 782,8; 742,5; 675,2; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,43 (s, 1H, -OH), 7,91 (d, 1H, *J* = 16, b), 7,58-7,50 (m, 3H, ArH: 2, 6; a), 7,39-7,35 (m, 1H, ArH: 2), 7,25 (m, 3H, ArH: 5, 3, 4), 6,95 (m, 1H, ArH: 5); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,10. 164,22. 162,25. 159,51. 157,53. 156,82. 144,34. 132,28. 130,25. 122,77. 121,87. 120,30. 119,53. 117,60. 114,82; **ESI-MS** *m/z* 260,9.

C20-46-Ch27

b-(2,6-Dihloro-fenil)-1-(2'-hidroksi-fenil)-propenon

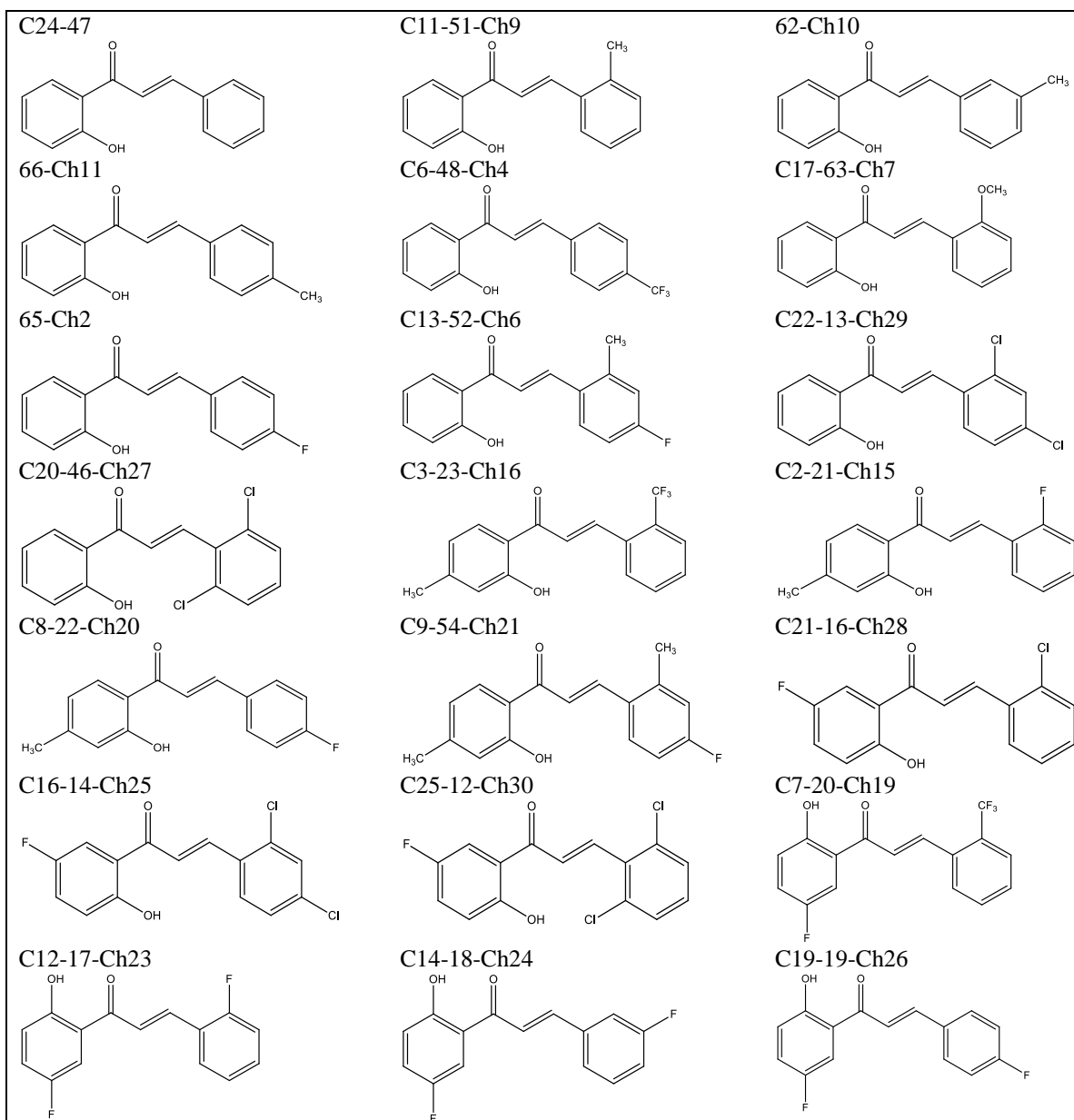
Žuta čvrsta supstanca je rekristalizovana iz etanola. **Prinos:** 82,58%. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1644,1; 1583,8; 1488,9 1205,3; 1155,8; 971,8; 772,8; 755,0; 744,86; 714,2; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,58 (s, 1H, -OH), 8,32 (d, 1H, *J* = 15,75, b), 7,73-7,58 (m, 4H, ArH 3, 4, 5, 6), 7,49-7,41 (m, 2H, ArH 4'; a), 7,07 (d, 1H, *J* = 6,97, 3), 6,89 (m, 1H, ArH: 5), 7,39-7,26 (m, 2H, ArH: 4, 5), 7,05-6,90 (m, 2H, ArH: 3', 5'); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,80. 163,79. 136,00. 135,77. 132,88. 133,74. 131,47. 130,06. 129,01. 127,72. 120,00. 119,71. 118,73; **ESI-MS** *m/z* 293,9.

Slika 24. Strukturna analiza sintetisanih jedinjenja IC, NMR i MS-MS spektroskopijom

4.3. Rezultati i diskusija određivanja lipofilnosti derivata propiofenona primjenom RP-TLC i kompjuterskih metoda

Lipofilnost jedinjenja je važan fizičko-hemijski parametar koji u velikoj mjeri određuje njegovu biološku aktivnost.

Imajući ovu činjenicu u vidu, nakon sprovedenih *docking* studija, sinteze i karakterizacije novih 17 halkona, određena je njihova lipofilnost računski (primjenom računarskih programa) i eksperimentalno (RP hromatografijom na tankom sloju) kao i lipofilnost 8 ranije sintetisanih halkona. Strukturne formule halkona prikazane su na slici 25.



Slika 25. Strukturne formule ispitivanih halkona

4.3.1. Određivanje parametara lipofilnosti primjenom RP-TLC metode

Hromatografsko ponašanje 25 halkona (Slika 25) ispitano je u uslovima RP TLC u kojima je stacionarnu fazu predstavljao modifikovani silika gel dok su mobilnu fazu činila tri dvokomponentna sistema rastvarača (acetonitril/voda, aceton/voda i etanol/voda). Retenciono ponašanje ispitivanih halkona prikazano je u tabeli 10.

Nakon određivanja R_f vrijednosti, primjenom jednačine 12 izračunate su R_M vrijednosti za ispitivane halkone (Prilog Tabela 1). Zavisnost izračunatih R_M vrijednosti od udjela organskog modifikatora određena je primjenom jednačine 13. Parametar lipofilnosti R_M^0 određen je ekstrapolacijom R_M vrijednosti na nula zapreminskog udjela organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Koncentracija organskog modifikatora za koju je raspodjela supstance između dvije faze jednaka (C_0) izračunata je primjenom jednačine 14. Vrijednosti za nagibe pravih (S), koeficijenti determinacije (R^2), parametar lipofilnosti (R_M^0) i C_0 za sva tri ispitivana hromatografska sistema prikazane su u tabeli 10.

Tabela 10. Parametri lipofilnosti određeni u primijenjenim RP-TLC sistemima

Jedinjenje	Acetonitril-voda					Aceton-voda					Etanol-voda				
	R_M	R_M^0	S	C_0	R^2	R_M	R_M^0	S	C_0	R^2	R_M	R_M^0	S	C_0	R^2
C25-12-Ch30	1,378	3,4536	-0,0373	92,5898	0,9793	1,03	4,7533	-0,0519	91,5857	0,9996	1,124	4,2983	-0,0488	88,0799	0,9928
C22-13-Ch29	1,449	3,9170	-0,0426	91,9484	0,9983	1,15	5,4817	-0,0620	88,4145	0,9903	1,087	4,1480	-0,0471	88,0679	0,9859
C16-14-Ch25	1,241	3,4576	-0,0392	88,2041	0,9816	0,91	4,9182	-0,0566	86,8940	0,9917	0,869	3,6590	-0,0429	85,2914	0,9949
C21-16-Ch28	1,264	3,6574	-0,0408	89,6422	0,9899	1,01	4,8513	-0,0552	87,8859	0,9875	0,890	3,5681	-0,0412	86,6044	0,9938
C12-17-Ch23	1,270	3,5691	-0,0412	86,6286	0,9926	0,89	5,2654	-0,0615	85,6163	0,9916	0,798	3,4150	-0,0403	84,7395	0,9926
C14-18-Ch24	1,207	3,6126	-0,0422	85,6066	0,9922	0,87	5,0341	-0,0589	85,4686	0,9913	0,780	3,2600	-0,0381	85,5643	0,9999
C19-19-Ch26	1,270	3,5763	-0,0431	82,9768	0,9676	0,78	4,9077	-0,0560	87,6375	0,9945	0,781	3,9698	-0,0491	80,8513	0,9939
C7-20-Ch19	1,242	3,5066	-0,0392	89,4541	0,9999	0,96	4,8328	-0,0552	87,5507	0,9783	0,828	3,7488	-0,0449	83,4922	0,9961
C2-21-Ch15	1,290	3,7371	-0,0427	87,5199	0,9937	0,96	4,8531	-0,0548	88,5602	0,9973	0,998	4,4154	-0,0526	83,9430	0,9847
C8-22-Ch20	1,241	3,4649	-0,0394	87,9416	0,9867	0,91	4,9529	-0,0578	85,6903	0,9843	0,788	3,4826	-0,0415	83,9181	0,9953
C3-23-Ch16	1,300	4,1238	-0,0465	88,6839	0,9900	1,10	4,9493	-0,0561	88,2228	0,9987	0,902	3,6793	-0,0427	86,1663	1,0000
C20-46-Ch27	1,347	3,9111	-0,0434	90,1175	0,9703	1,09	4,9731	-0,0558	89,1237	0,9962	1,088	4,2856	-0,0492	87,1057	0,9942
C24-47	1,211	3,7433	-0,0455	82,2703	0,9888	0,78	5,0706	-0,0594	85,3636	0,9848	0,730	3,3953	-0,0410	82,8122	0,9967
C6-48-Ch4	1,182	3,3444	-0,0389	85,9743	0,9856	0,82	4,8673	-0,0567	85,8430	0,9736	0,741	3,4286	-0,0413	83,0169	0,9962
C11-51-Ch9	1,229	3,4652	-0,0392	88,3980	0,9880	0,92	4,8821	-0,0562	86,8701	0,9887	0,884	3,9320	-0,0469	83,8380	0,9813
C13-52-Ch6	1,240	3,4954	-0,0397	88,0453	0,9911	0,92	4,8117	-0,0549	87,6448	0,9853	0,846	3,7729	-0,0450	83,8422	0,9996
C9-54-Ch21	1,352	4,0665	-0,0456	89,1776	0,9830	1,10	4,8475	-0,0538	90,1022	0,9991	1,000	4,3749	-0,0519	84,2948	0,9928
62-Ch10	1,215	3,5507	-0,0408	87,0270	0,9951	0,90	5,0112	-0,0584	85,8082	0,9918	0,896	3,5926	-0,0415	86,5687	0,9979
C17-63-Ch7	1,096	3,4131	-0,0404	84,4827	0,9901	0,80	4,6424	-0,0546	85,0256	0,9920	0,735	3,2562	-0,0388	83,9227	0,9925
65-Ch2	1,178	3,2629	-0,0392	83,2372	0,9873	0,72	3,8105	-0,0405	94,0864	0,9717	0,737	3,2556	-0,0388	83,9072	0,9968
66-Ch11	1,170	3,5521	-0,0411	86,4258	0,9909	0,88	4,0757	-0,0447	91,1790	0,9960	0,882	3,5402	-0,0409	86,5575	0,9941

Dobijeni rezultati pokazali su statistički značajnu linearnu zavisnost na šta ukazuju vrijednosti koeficijenta determinacije $R^2 > 0,98$ (Tabela 10).

Parametar S je povezan sa specifičnom hidrofobnom površinom [140]. Visoki koeficijenti korelacije između R_M^0 i S ukazuju da testirana jedinjenja formiraju kongenerični skup i slični mehanizmi utiču na njihovo retenciono ponašanje. U svim hromatografskim sistemima primijećena je visoka korelacija između R_M^0 i S ($r = 0,87 - 0,97$) (Tabela 10), što je posljedica visokog stepena strukturne sličnosti ispitivanih jedinjenja i može se očekivati da u svakom primijenjenom sistemu u kome je stacionarna faza modifikovani silikagel postoje slični mehanizmi odgovorni za interakcije jedinjenja sa stacionarnom fazom (nespecifične hidrofobne interakcije).

Pored nespecifičnih interakcija sa stacionarnom fazom na retenciju jedinjenja utiču i interakcije sa mobilnom fazom. Promjena organskog modifikatora u mobilnoj fazi kao i njegovog udjela utiču na retenciona ponašanja jedinjenja. Na površini modifikovanog silika gela, kao stacionarne faze, nalaze se zaostale, nemođifikovane silanolne grupe sa kojima interaguju molekuli rastvarača iz mobilne faze formirajući vodonične proton-donor akceptorske ili dipol-dipol interakcije. U ovom radu upotrijebljena su tri organska rastvarača: acetonitril, aceton i etanol koji prema Snyderovom trouglu [141] pripadaju različitim grupama rastvarača. Acetonitril i aceton su grupa VI, dok je etanol kao alifatični alkohol u grupi II, pa se samim tim razlikuju po proton donor/akceptorskim osobinama, dipolnom momentu i sl. (Tabela 11). Razlike postoje i u eluacionoj moći rastvarača, koja za RP-18 stacionarnu fazu opada u sledećem nizu: etanol ($S = 3,6$), aceton ($S = 3,4$), acetonitril ($S = 3,1$). Na osnovu izračunatih R_M vrijednosti ispitivanih jedinjenja u sva tri hromatografska sistema može se zaključiti da je retencija ispitivanih jedinjenja najmanja u sistemu koji za organski modifikator ima etanol (Tabela 10).

Tabela 11. Karakteristike primijenjenih organskih modifikatora

Organski modifikator	χ_e	χ_d	χ_n
Acetonitril	0,33	0,26	0,41
Aceton	0,36	0,24	0,40
Etanol	0,51	0,21	0,28

χ_e - proton akceptorska svojstva rastvarača; χ_d - proton donorska svojstva rastvarača;

χ_n - dipolarna svojstva rastvarača

Ako se uporede karakteristike organskih rastvarača uočava se bitna razlika u proton akceptorskim svojstvima etanola (Tabela 11). Etanol reaguje sa slobodnim silanolnim grupama stacionarne faze i na taj način smanjuje mogućnost interakcija fenolnih grupa ispitivanih jedinjenja sa slobodnim silanolnim grupama na površini stacionarne faze, a time i slabije retencije. Interakcije koje ostvaruju acetonitril i aceton daleko su slabije te je retencija jedinjenja u ovim sistemima veća. Niske vrijednosti korelacionih koeficijenta (Tabela 12) koje su dobijene poređenjem R_M^0 za sistem etanol/voda sa R_M^0 za preostala dva hromatografska sistema takođe potvrđuju da se etanol razlikuje po karakteristikama od acetonitrila i acetona.

Tabela 12. Vrijednosti koeficijenta korelacije R_M^0 za ispitivane hromatografske sisteme

	R_M^0 (Etanol-voda)
R_M^0 (Acetonitril-voda)	0,644
R_M^0 (Aceton-voda)	0,262
R_M^0 (Etanol-voda)	1,000

4.3.2. Određivanje parametara lipofilnosti primjenom kompjuterskih programa

Pored hromatografskog određivanja parametara lipofilnosti, lipofilnost ispitivanih jedinjenja izračunata je kao vrijednost $\text{Log}P$ primjenom kompjuterskih programa *ChemDraw 8* (*Viswanadhan LogP*, *Brotto LogP*, *Crippen LogP* i *CLogP*) i *MarvinSketch* (Tabela 13).

Tabela 13. Izračunate $\text{log}P$ vrijednosti za ispitivana jedinjenja

Jedinjenje	Izračunate $\text{Log}P$ vrijednosti				
	Viswanadhan $\text{Log}P$	Broto $\text{Log}P$	Crippen $\text{Log}P$	CLogP	Marvin $\text{Log}P$
C25-12-Ch30	4,57	4,33	4,47	5,65	5,59
C22-13-Ch29	4,43	4,20	4,31	5,38	5,44
C16-14-Ch25	4,57	4,33	4,47	5,65	5,59
C21-16-Ch28	4,05	3,72	3,91	4,94	4,98
C12-17-Ch23	3,67	3,23	3,51	4,37	4,52
C14-18-Ch24	3,67	3,23	3,51	4,37	4,52
C19-19-Ch26	3,67	3,23	3,51	4,37	4,52
C7-20-Ch19	4,41	4,08	4,27	5,11	5,26
C2-21-Ch15	4,00	3,51	3,84	4,60	4,89
C8-22-Ch20	4,00	3,51	3,84	4,60	4,89
C3-23-Ch16	4,74	4,36	4,60	5,34	5,63
C20-46-Ch27	4,43	4,20	4,31	5,38	5,44
C24-47	3,39	2,96	3,20	3,96	4,24
C6-48-Ch4	4,27	3,94	4,12	4,84	5,11
C11-51-Ch9	3,86	3,38	3,68	4,46	4,75
C13-52-Ch6	4,00	3,51	3,84	4,60	4,89
C9-54-Ch21	4,47	3,93	4,33	5,10	5,41
62-Ch10	3,86	3,38	3,68	4,46	4,75
C17-63-Ch7	3,14	3,09	3,07	3,88	4,08
65-Ch2	3,53	3,10	3,35	4,10	4,38
66-Ch11	3,86	3,38	3,68	4,46	4,75

Iako se izračunate $\text{Log}P$ vrijednosti za jedno isto jedinjenje međusobno razlikuju (posljedica primjene različitih algoritama koji su inkorporirani u kompjuterskim programima), dobijene

vrijednosti za koeficijent korelacije koje su se kretale u opsegu od 0,96 do 1,00 ukazuju na visok stepen slaganja između izračunatih vrijednosti $\text{Log}P$ (Prilog Tabela 2).

Da bi ustanovili koji hromatografski sistem može da se sa pouzdanošću upotrijebi za dobijanje parametara koji se mogu koristiti u opisivanju lipofilnosti jedinjenja (R_M^0 , C_0 i S) izračunate $\text{Log}P$ vrijednosti poređene su sa eksperimentalno određenim parametrima za sva tri hromatografska sistema (Prilog Tabela 2).

Koeficijenti korelacije između izračunatih $\text{Log}P$ vrijednosti i hromatografskih parametara su: 0,80 – 0,84 ($\text{Log}P / C_0 = f(\text{Log}P)$, acetonitril-voda), 0,23 – 0,29 ($C_0 = f(\text{Log}P)$, aceton-voda), 0,47 – 0,56 ($C_0 = f(\text{Log}P)$, etanol-voda), 0,39 – 0,44 ($R_M^0 = f(\text{Log}P)$, acetonitril-voda), 0,26 – 0,29 ($R_M^0 = f(\text{Log}P)$, aceton-voda), 0,53 – 0,61 ($R_M^0 = f(\text{Log}P)$, etanol-voda), ispod 0,05 ($S = f(\text{Log}P)$, acetonitril-voda), 0,29 – 0,36 ($S = f(\text{Log}P)$, aceton-voda) i 0,38 – 0,43 ($S = f(\text{Log}P)$, etanol-voda). Najveći stepen slaganja postoji između C_0 vrijednosti za hromatografski sistem acetonitril-voda i izračunatih $\text{Log}P$ vrijednosti (r vrijednost od 0,80 do 0,84), pa se jednačina koja opisuje ovu zavisnost može upotrijebiti za predviđanje retencije novih halkona. Sistem acetonitril-voda je odabran kao najpouzdaniji za detaljnije proučavanje odnosa između strukture i retencije kongenerisanih halkona.

4.3.3. QSRR analiza

Da bi se opisala veza između retencije i strukture ispitivanih jedinjenja upotrijebljene su različite regresione analize MLR, PLS i SVM u cilju formiranja modela koji bi na najbolji način kvantitativno opisao vezu između C_0 kao parametra lipofilnosti i molekulskih deskriptora koji bi se mogli koristiti u predviđanju lipofilnosti novosintetisanih halkona.

Da bi se smanjio broj deskriptora i olakšalo uspostavljanje korelacije između retencije i deskriptora izvršena je njihova selekcija primjenom algoritma *Feature selection and variable screening (FSVS)*, implementiranog u programu *Statistica*. Nakon eliminacije deskriptora koji visoko međusobno korelišu u sledećem koraku odabrani su oni deskriptori koji pokazuju najbolju korelaciju sa vrijednostima C_0 (Tabela 14).

Tabela 14. Deskriptori koji pokazuju najbolju korelaciju sa vrijednostima C_0

Regresiona analiza	Deskriptori
MLR	bcutp8, ATSp4, kappam2
PLS	bcutv9, bcutv7, Chiv8, Chiv5, Chiv4, Chiv7, Chiv6, Chiv1, Chiv3, bcutm8, bcutm2, ATSp3, ATSp7, ATSp6, ATSp4, ATSp8, bcutv15, bcutv16, bcutv10, MR, bcutp16, bcutp10, Smax53, LogP2, LogP, Smin53, bcutp9, bcutp7, Chiv4pc, MATSp6
SVM	bcutp8, ATSp4, kappam2

Prije izvođenja regresionih analiza ispitivana jedinjenja podijeljena su u dvije grupe: na test i trening set, a odabir jedinjenja za određeni set bio je nasumičan. Kako veličina trening seta utiče na kvalitet modela i smatra se da je optimalna količina podataka koji su potrebni za

njegovo formiranje 15-40% od ukupnih u ovom radu za formiranje test seta uzeto je 5 jedinjenja (C22-13-Ch29, C14-18-Ch24, C7-20-Ch19, C3-23-Ch16 i C17-63-Ch7), a preostalih 20 činilo je trening set. Formirana su tri QSRR modela. Vrijednosti C_0 , određene u RP-TLC sistemu acetonitril-voda, korišćene su kao zavisno promjenljive, dok su odabrani molekularni deskriptori, predstavljali nezavisno promjenljive. Kvalitet formiranog modela procenjen je na osnovu statističkih parametara: Q^2 , r , R^2 , RMSEE i RMSEP. QSRR model se smatra pouzdanim ako su zadovoljeni sledeći uslovi: $Q^2 > 0,5$; $R^2 > 0,6$; $r > 0,7$, a vrijednosti RMSEE i RMSEP treba da budu što niže (Tabela 15).

Tabela 15. Izračunati statistički parametri

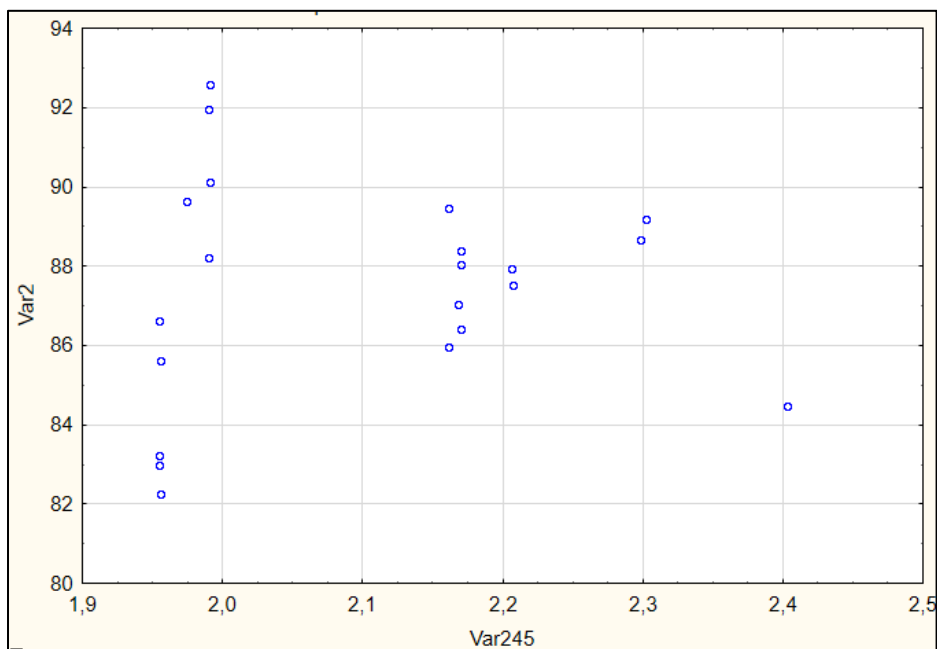
QSRR model	RMSEE	Q^2	RMSEP	r	R^2_{pred}
MLR(C_0)	1,20	0,64	2,87	0,43	0,79
PLS(C_0)	1,11	0,63	2,36	0,56	0,86
SVM(C_0)	1,14	0,68	1,57	0,83	0,94

Izračunati statistički parametri, $r = 0,83$, $R^2_{pred} = 0,94$, $Q^2 = 0,68$ ukazuju da formirani SVM (C_0) model u poređenju sa MLR(C_0) i PLS(C_0) modelima pokazuje najbolju moć predviđanja i kao takav se može koristiti za predviđanje retencije i lipofilnosti novih strukturno sličnih jedinjenja. Za formiranje SVM (C_0) modela odabrana su tri deskriptora: bcutp8, ATSp4 i kappam2 čije su vrijednosti prikazane u tabeli 3 datoj u Prilogu. Vrijednosti koeficijenata uz molekularne deskriptore govore o uticaju tih deskriptora na retenciju ispitivanih jedinjenja, što znači da pozitivna vrijednost koeficijenta govori da sa povećanjem te vrijednosti dolazi do povećanja vrijednosti C_0 .

Burdenov bcutp8 deskriptor kao i Moreau-Brotov topološki deskriptor ATSp4 opisuju polarizabilnost molekula [142-146], dok kappam2, koji predstavlja Kappa indeks, opisuje oblik molekula [147].

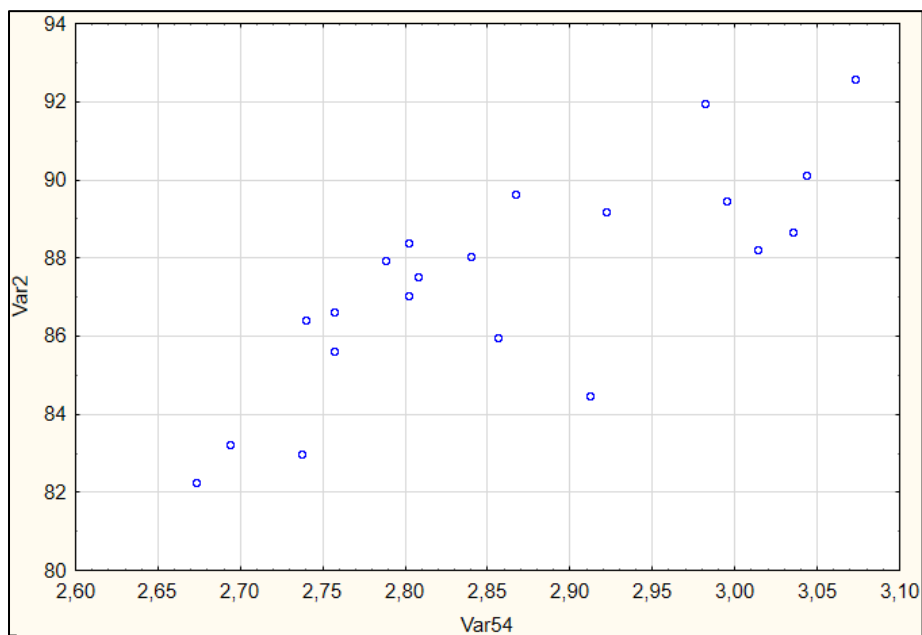
Na osnovu vrijednosti bcutp8 deskriptora ispitivana jedinjenja se mogu svrstati u dvije grupe: jedinjenja sa bcutp8 vrijednostima između 1,90 i 2,00 (prva grupa: 12-Ch14, 13-Ch15, C16-14-Ch16, 16-Ch17, C12-17-Ch18, C14-18-Ch19, C19-19-Ch20, C20-46-Ch25, 47, 65-Ch2) i jedinjenja sa bcutp8 vrijednostima između 2,10 i 2,45 (druga grupa: C7-20-Ch19, C2-21-Ch15, C8-22-Ch20, C3-23-Ch16, C6-48-Ch4, C11-51-Ch9, C13-52-Ch6, C9-54-Ch21, 62-Ch10, C17-63-Ch7, 66-Ch11). Vrijednosti C_0 za jedinjenja druge grupe nalaze se u uskom intervalu od 84 do 90, dok je za jedinjenja prve grupe taj interval daleko širi (od 82 do 94) što ukazuje da odabrani deskriptor bolje opisuje retenciju jedinjenja druge u odnosu na jedinjenja prve grupe.

Ako se analizira struktura izdvojenih jedinjenja može se zaključiti da je kod svih jedinjenja druge grupe u prstenu A prisutna elektronegativna fluoro ili/i trifluorometil grupa. Odnos između C_0 i bcutp8 prikazan je na slici 26.



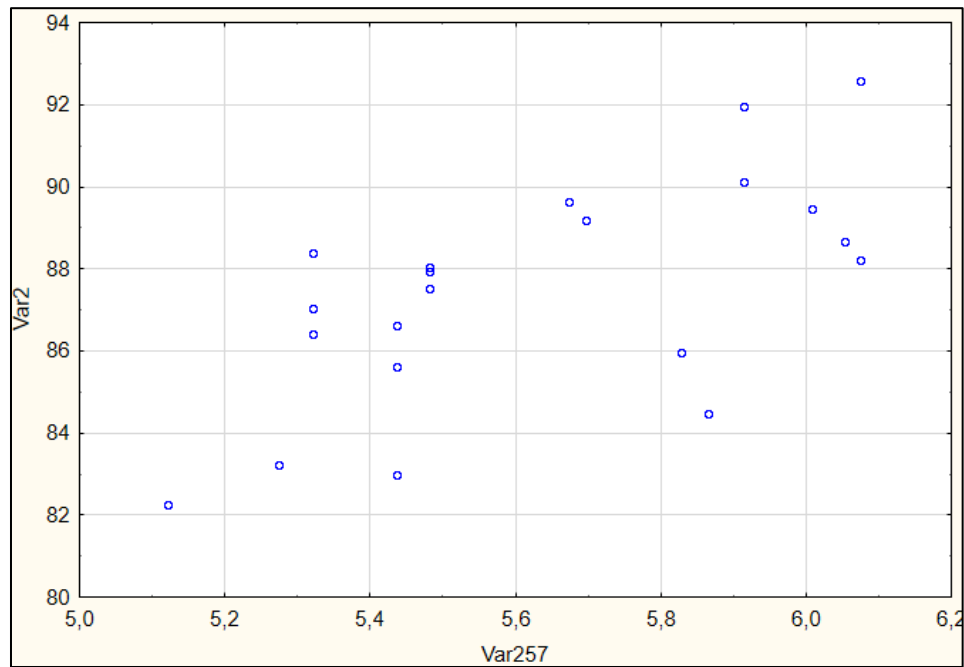
Slika 26. Grafik odnosa C_0 (var2) i bcutp8 (var245)

Odnos između C_0 i ATSp4 prikazan je na slici 27. Najveće vrijednosti ovog deskriptora posjeduju jedinjenja sa visokim C_0 i visokim izračunatim $\text{Log}P$ vrijednostima (C25-12-Ch30 i C20-46-Ch27), dok najniže vrijednosti imaju jedinjenja sa niskim C_0 i niskim izračunatim $\text{Log}P$ vrijednostima (npr. C24-47 i 65-Ch2), što ukazuje da deskriptor ATSp4 dobro opisuje vezu između lipofilnosti i retencije ispitivanih jedinjenja.



Slika 27. Grafik odnosa C_0 (var2) i ATSp4 (var54)

Odnos između C_0 i κ_2 prikazan je na slici 28. Najveće vrijednosti ovog deskriptora posjeduju jedinjenja sa visokim C_0 (npr. C25-12-Ch30, C22-13-Ch29 i C20-46-Ch27), dok najniže vrijednosti imaju jedinjenja sa niskim C_0 (npr. C24-47 i 65-Ch2). Jedinjenja C25-12-Ch30, C22-13-Ch29 i C20-46-Ch27 posjeduju veći broj supstituenata na benzenovim prstenovima što uslovljava i veću zapreminu molekula u poređenju sa C24-47 i 65-Ch2 kod kojih su na benzenovim prstenovima prisutan jedan ili dva supstituenta.



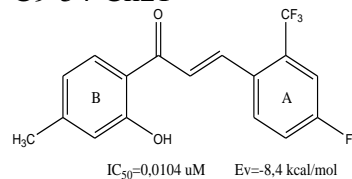
Slika 28. Grafik odnosa C_0 (var2) i κ_2 (var257) .

4.4. Rezultati i diskusija *in vitro* ispitivanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti derivata propiofenona

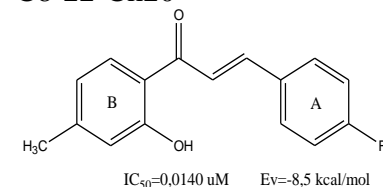
In vitro ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sprovedeno je sa 20, od ukupno 30 propiofenonskih derivata (halkona) i tri registrovana inhibitora HIV-1 proteaze (lopinavir, ritonavir i darunavir). Za odabir halkona korišćenih u ispitivanju postavljen je kriterijum: $E_v \geq 8,0$ kcal. Strukture ispitivanih halkona prikazane su na slici 29, a rezultati anti-HIV-1 proteazne aktivnosti za novosintetisane halkone i registrovane inhibitore u tabelama 16 i 17.

Halkoni, Derivati osnovne strukture I

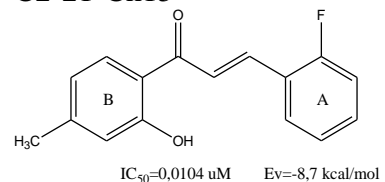
C9-54-Ch21



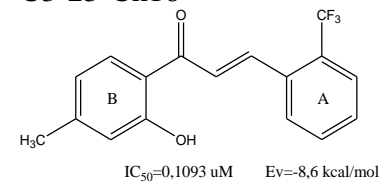
C8-22-Ch20



C2-21-Ch15

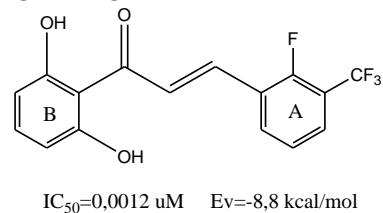


C3-23-Ch16

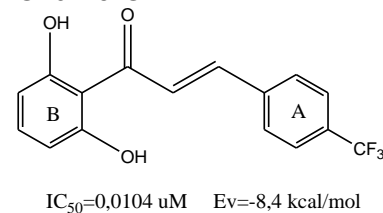


Halkoni, Derivati osnovne strukture II

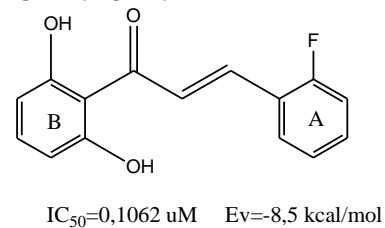
C1-42-Ch14



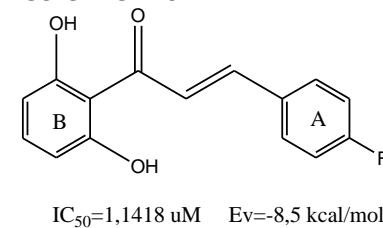
C10-26-Ch22



C4-27-Ch17

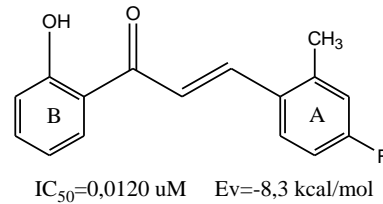


C5-32-Ch18

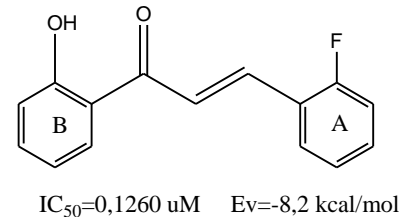


Halkoni, Derivati osnovne strukture III

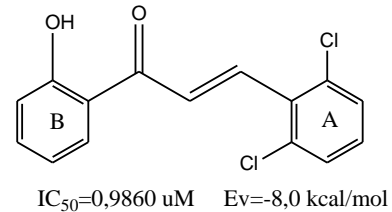
C13-52-Ch6



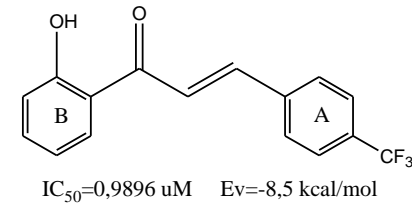
C15-Ch1

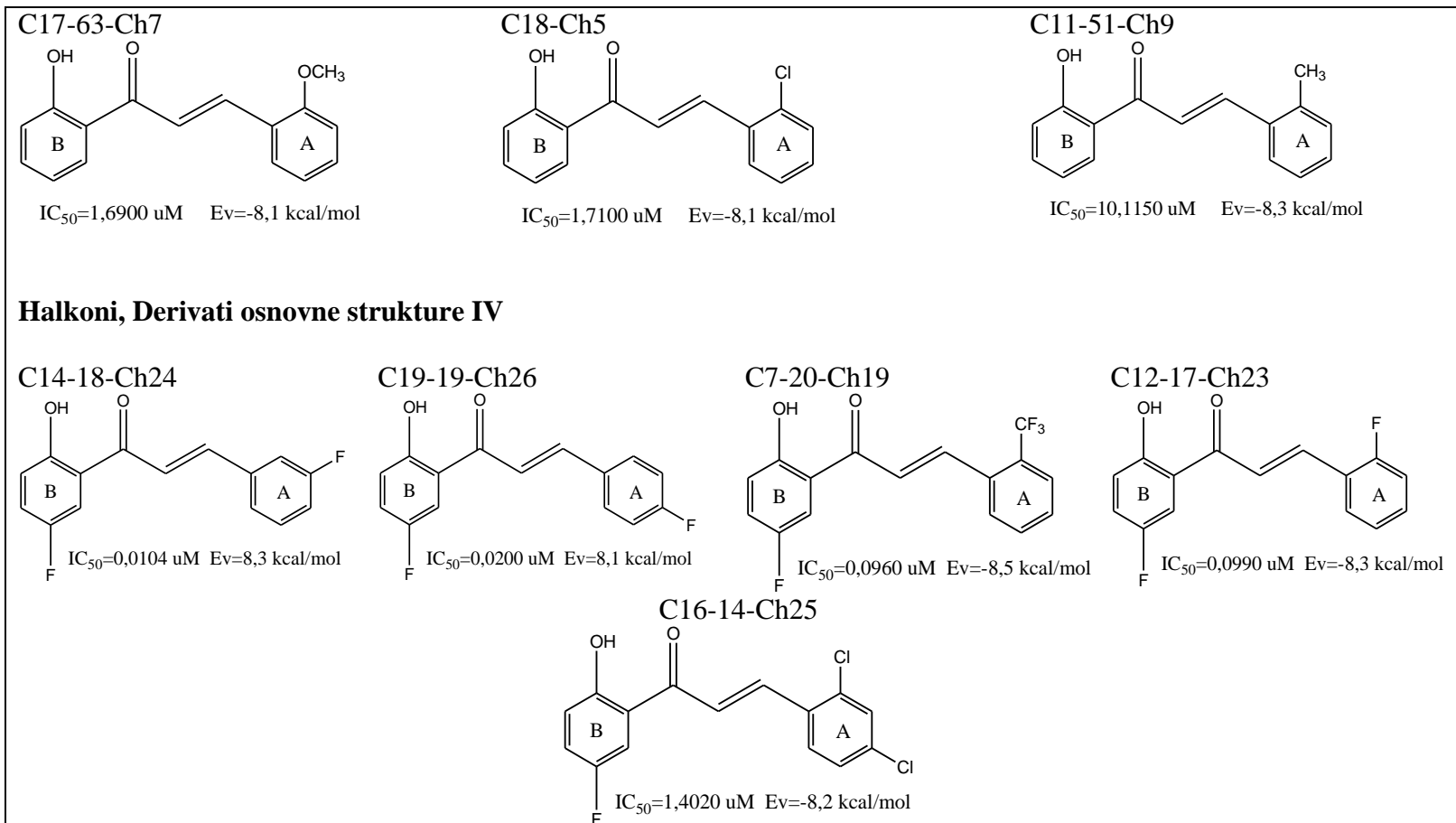


C20-46-Ch27



C6-48-Ch4





Slika 29. Strukturne formule halkona korišćenih u *in vitro* ispitivanjima anti-HIV-1 proteazne aktivnosti

Tabela 16. Rezultati *in vitro* ispitivanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti odabranih halkona

Jedinjenje	C ($\mu\text{mol/l}$)	RFU	RFU/kal	RA (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)	Ev (kcal/mol)
C1-42-Ch14	100,000	266,50	0,38	38,18	0,0012	-8,8
	10,000	242,00	0,35	34,67		
	1,000	275,00	0,39	39,40		
	0,500	293,00	0,42	41,98		
	0,100	231,00	0,33	33,09		
	0,010	288,00	0,41	41,26		
	0,001	320,50	0,46	46,05		
C2-21-Ch15	100,000	260,30	0,37	37,29	0,1040	-8,7
	10,000	308,30	0,44	44,17		
	1,000	254,30	0,36	36,43		
	0,500	286,00	0,41	40,97		
	0,100	335,30	0,48	48,17		
	0,010	316,00	0,45	45,27		
C3-23-Ch16	100,000	301,67	0,43	43,22	0,1093	-8,6
	10,000	315,33	0,45	45,18		
	1,000	287,67	0,41	41,21		
	0,500	291,52	0,41	41,76		
	0,100	319,33	0,46	45,75		
	0,010	277,00	0,40	39,68		
C4-27-Ch17	100,000	292,00	0,42	41,83	0,1062	-8,5
	10,000	326,67	0,47	46,80		
	1,000	328,67	0,47	47,09		
	0,500	330,12	0,47	47,29		
	0,100	404,00	0,58	57,88		
	0,010	441,00	0,63	63,18		
C5-32-Ch18	100,000	252,33	0,36	36,15	1,1418	-8,5
	10,000	298,67	0,43	42,79		
	1,000	305,67	0,44	43,79		
	0,500	259,50	0,37	37,18		
	0,100	286,00	0,41	40,97		
	0,010	296,00	0,42	42,41		
C6-48-Ch4	100,000	305,00	0,44	43,70	0,9896	-8,5
	10,000	277,67	0,40	39,78		
	1,000	352,67	0,51	50,53		
	0,500	349,00	0,50	50,00		
	0,100	324,33	0,46	46,47		
	0,010	284,33	0,41	40,73		

C7-20-Ch19	100,000	267,67	0,38	38,35	0,0960	-8,5
	10,000	287,33	0,41	41,16		
	1,000	262,00	0,38	37,54		
	0,500	270,12	0,39	38,70		
	0,100	363,00	0,52	52,01		
	0,010	266,67	0,38	38,20		
C8-22-Ch20	100,000	240,33	0,34	34,43	0,0140	-8,5
	10,000	287,00	0,41	41,26		
	1,000	278,00	0,40	39,83		
	0,500	281,01	0,40	40,26		
	0,100	283,00	0,41	40,54		
	0,010	288,33	0,41	41,31		
C9-54-Ch21	0,001	276,22	0,39	39,57	0,0104	-8,4
	100,000	225,33	0,32	32,28		
	10,000	251,33	0,36	36,01		
	1,000	243,67	0,35	34,91		
	0,500	228,50	0,33	32,74		
	0,100	307,67	0,44	44,08		
	0,010	335,33	0,48	48,04		
C10-26-Ch22	0,001	242,55	0,35	34,75	0,0104	-8,4
	100,000	275,33	0,39	39,45		
	10,000	423,33	0,61	60,65		
	1,000	242,33	0,35	34,72		
	0,500	222,00	0,32	31,81		
	0,100	266,00	0,38	38,11		
	0,010	296,67	0,43	42,50		
C11-51-Ch9	0,001	289,22	0,41	41,43	10,1150	-8,3
	100,000	271,67	0,39	38,92		
	10,000	304,33	0,44	43,60		
	1,000	228,00	0,33	32,66		
	0,500	246,50	0,35	35,32		
	0,100	284,67	0,41	40,78		
	0,010	287,00	0,41	41,12		
C12-17-Ch23	100,000	331,67	0,48	47,52	0,0990	-8,3
	10,000	250,33	0,36	35,86		
	1,000	278,67	0,40	39,92		
	0,500	224,50	0,32	32,16		
	0,100	352,67	0,51	50,53		
	0,010	300,67	0,43	43,08		

C13-52-Ch6	100,000	300,00	0,43	43,08	0,0120	-8,3
	10,000	259,33	0,37	37,15		
	1,000	253,00	0,36	36,25		
	0,500	288,50	0,41	41,33		
	0,100	270,00	0,39	38,68		
	0,010	305,67	0,44	43,78		
	0,001	280,25	0,40	40,15		
C14-18-Ch24	100,000	306,67	0,44	43,94	0,0104	-8,3
	10,000	242,33	0,35	34,72		
	1,000	234,33	0,34	33,57		
	0,500	196,00	0,28	28,08		
	0,100	293,33	0,42	42,02		
	0,010	351,33	0,50	50,33		
	0,001	305,22	0,44	43,73		
C15-Ch1	0,010	236,52	0,33	33,89	0,1260	-8,2
	0,100	276,00	0,40	39,54		
	0,500	218,50	0,31	31,30		
	1,000	218,50	0,31	31,30		
	10,000	219,01	0,31	31,38		
	100,000	226,05	0,32	32,38		
C16-14-Ch25	0,010	210,05	0,30	30,10	1,4020	-8,2
	0,100	187,00	0,27	26,79		
	0,500	208,00	0,30	29,80		
	1,000	279,00	0,40	39,97		
	10,000	210,00	0,30	30,08		
	100,000	199,00	0,28	28,51		
C17-63-Ch7	0,010	212,52	0,30	30,44	1,6900	-8,1
	0,100	200,50	0,29	28,72		
	0,500	205,22	0,29	29,40		
	1,000	206,50	0,30	29,58		
	10,000	200,98	0,28	28,79		
	100,000	189,22	0,27	27,11		
C18-Ch5	0,010	179,22	0,25	25,68	1,7100	-8,1
	0,100	178,50	0,26	25,57		
	0,500	204,50	0,29	29,30		
	1,000	304,50	0,43	43,62		
	10,000	222,12	0,31	31,82		
	100,000	290,11	0,41	41,56		

C19-19-Ch26	0,010	174,11	0,25	24,93	0,0200	-8,1
	0,100	274,00	0,39	39,25		
	0,500	179,02	0,26	25,65		
	1,000	153,50	0,22	21,99		
	10,000	158,22	0,23	22,66		
	100,000	150,23	0,21	21,52		
C20-46-Ch27	0,010	205,00	0,29	29,32	0,9860	-8,0
	0,100	221,00	0,32	31,66		
	0,500	223,00	0,31	31,95		
	1,000	266,50	0,38	38,18		
	10,000	246,22	0,35	35,27		
	100,000	210,21	0,30	30,12		

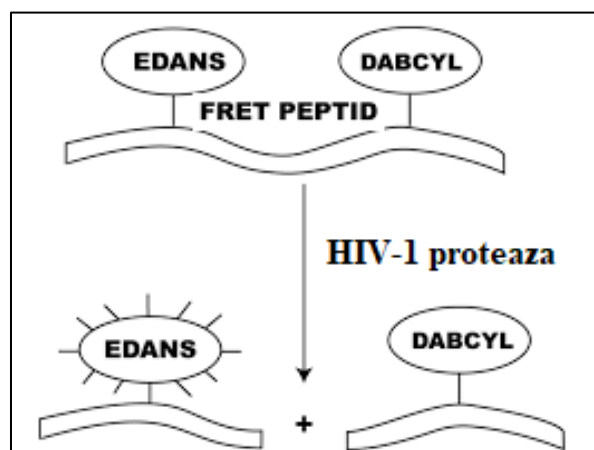
C - teorijska koncentracija; RFU - relativna fluorescentna jedinica; RFU/kal - odnos RFU jedinjenja i maksimalne fluorescencije referentnog standarda EDANS-a; RA - procenat relativne aktivnosti enzima; IC₅₀ - vrijednost koncentracije jedinjenja koja je potrebna da dovede do 50% inhibicije HIV-1 proteaze; Ev - energija vezivanja

Tabela 17. Rezultati *in vitro* ispitivanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti registrovanih inhibitora HIV-1 proteaze

Jedinjenje	C (µM)	RFU	RFU/kal	RA (%)	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM) literaturno
Darunavir	100,000	262,00	0,37	37,53	0,000967	0,001-0,002
	10,000	306,00	0,44	43,84		
	1,000	273,00	0,39	39,11		
	0,100	241,00	0,34	34,53		
	0,010	314,50	0,45	45,06		
	0,001	361,00	0,52	51,72		
Lopinavir	100,000	295,00	0,42	42,26	0,010290	0,017
	10,000	342,50	0,49	49,07		
	1,000	168,00	0,24	24,07		
	0,100	261,00	0,37	37,39		
	0,010	274,50	0,39	39,32		
	0,001	272,50	0,39	39,04		
Ritonavir	100,000	272,00	0,39	38,97	0,055000	0,025
	10,000	251,50	0,36	36,03		
	1,000	263,00	0,38	37,68		
	0,100	294,50	0,42	42,19		
	0,010	439,50	0,63	62,97		
	0,001	267,00	0,38	38,25		

C - teorijska koncentracija; RFU - relativna fluorescentna jedinica; RFU/kal - odnos RFU jedinjenja i maksimalne fluorescencije referentnog standarda EDANS-a; RA - procenat relativne aktivnosti enzima; IC₅₀ - vrijednost koncentracije jedinjenja koja je potrebna da dovede do 50% inhibicije HIV-1 proteaze

U ispitivanju inhibitorne aktivnosti halkona korišćena je FRET metoda koja se zasniva na mjerenju intenziteta fluorescencije fluorifore (EDANS) koja se u reakciji enzim-peptid oslobađa kao dio peptida (Slika 30). Intenzitet fluorescencije srazmjeran je količini fluorifore tj. enzimskoj aktivnosti. Kako opada intenzitet fluorescencije, srazmjerno opada i enzimska aktivnost.



Slika 30. FRET metoda – zasniva se na mjerenju intenziteta fluorescencije fluorifore (EDANS) koja se oslobađa kao dio peptida u proteolitičkoj reakciji enzim-peptid (Preuzeto i prilagođeno iz AnaSpec, Inc. [homepage on the Internet] AnaSpec, Inc.; c2002 2020 [cited 2020 Nov 24]. Available from: <https://www.anaspec.com/products/product.asp?id=29671>)

Osjetljivost instrumenta za mjerenje intenziteta fluorescencije u širokom opsegu, ispitana je uz pomoć fluorescentnog referentnog standarda EDANS-a koji je u te svrhe pripremljen u koncentracionom opsegu od 31,5 do 500,0 nM. Za svaku od pripremljenih koncentracija izmjereni su intenziteti fluorescencije i određene RFU. Dobijene vrijednosti RFU i statistički podaci za kalibracionu krivu dati su u tabeli 4 u Prilogu.

Aktivnost HIV-1 proteaze testirana je uz pomoć potentnog komercijalnog inhibitora Pepstatina A. Bazenčić u kome se nalazio rastvor sa Pepstatinom i enzimom pokazao je slab intenzitet fluorescencije čime je potvrđena inhibitorna aktivnost Pepstatina A, tj. enzimska aktivnost.

Ispitivanje inhibitornog djelovanja novosintetisanih halkona prema HIV-1 proteazi obuhvatalo je tri faze.

Ispitivanje inhibitornog djelovanja, započeto je tzv. preliminarnom fazom u kojoj je ispitana aktivnost 20 odabranih halkona i 3 registrovana inhibitora u tri koncentracije od 1 μ M, 10 μ M i 100 μ M. Cilj preliminarne faze je bio da se ispita potencijal inhibitorne aktivnosti halkona i izdvoje oni koji inhibiraju aktivnost proteaze približno 50%. Rezultati eksperimenata pokazali su da 19 ispitivanih halkona pokazuju zadovoljavajuću aktivnost u koncentraciji od 1 μ M (Tabela 16), dok je halkan C11-51-Ch9 zadovoljavajuću aktivnost postigao u koncentraciji od 10 μ M (Tabela 16).

Sledeća faza ispitivanja obuhvatala je 19 halkona čija je aktivnost ispitana u koncentracijama od 0,01; 0,10; 0,50; 1,00 i 10,00 μM . Od 19 ispitivanih halkona, šest halkona (C1-42-Ch1, C9-54-Ch21, C10-26-Ch22, C14-18-Ch24, C13-52-Ch6, C8-22-Ch20) je u koncentraciji od 0,01 μM inhibiralo približno 50% enzimске aktivnosti (Tabela 16), šest (C7-20-Ch19, C12-17-Ch23, C2-21-Ch15, C4-27-Ch17, C3-23-Ch16, C15-Ch1) u koncentraciji od 0,10 μM dok su halkoni: C20-46-Ch27, C6-48-Ch4, C5-32-Ch18, C16-14-Ch25, C17-63-Ch7 i C18-Ch5 približno 50% enzimске aktivnosti inhibirali u koncentraciji od 1,00 μM .

Za halkone: C1-42-Ch1, C9-54-Ch21, C10-26-Ch22, C14-18-Ch24, C13-52-Ch6, C8-22-Ch20, kao i 3 registrovana inhibitora ispitana je aktivnost i pri 10 puta nižoj koncentraciji od 0,001 μM . Od 6 ispitivanih halkona, samo je halkan C1-42-Ch1 pokazao bolju aktivnost u koncentraciji od 0,001 μM . Kod preostalih 5 halkona inhibitorna aktivnost je slabija nego pri koncentraciji od 0,010 μM (Tabela 16).

Sumirajući rezultate anti-HIV-1 proteazne aktivnosti iz tabele 16 može se napraviti opšti redosled aktivnosti halkona, kao i redosled aktivnosti po grupama:

Opšti redosled aktivnosti:

C1-42-Ch14 > C9-54-Ch21 = C10-26-Ch22 = C14-18-Ch24 > C13-52-Ch6 > C8-22-Ch20 > C19-19-Ch26 > C7-20-Ch19 > C12-17-Ch23 > C2-21-Ch15 > C4-27-Ch17 > C3-23-Ch16 > C15-Ch1 > C20-46-Ch27 > C6-48-Ch4 > C5-32-Ch18 > C16-14-Ch25 > C17-63-Ch7

Redosled aktivnosti po grupama:

Derivati opšte strukture I: C9-54-Ch21 > C8-22-Ch20 > C2-21-Ch15 > C3-23-Ch16
Derivati opšte strukture II: C1-42-Ch14 > C10-26-Ch22 > C4-27-Ch17 > C5-32-Ch18
Derivati opšte strukture III: C13-52-Ch6 > C15-Ch1 > C20-46-Ch27 > C6-48-Ch4 > C17-63-Ch7 > C18-Ch5 > C11-51-Ch9
Derivati opšte strukture IV: C14-18-Ch24 > C19-19-Ch26 > C7-20-Ch19 > C12-17-Ch23 > C16-14-Ch25

Analizom rezultata određenih inhibitornih aktivnosti ispitivanih halkona po grupama (četiri osnovne strukture) (Slika 29) uočava se da u okviru svake grupe fluorirani derivati ispoljavaju bolju inhibitornu aktivnost u poređenju sa hloro, alkoksi i alkil derivatima (Slika 29).

Derivat strukture III C13-52-Ch6 ($\text{IC}_{50}=0.0120$) sa fluoro grupom *para* pozicioniranom u prstenu A (Slika 29), kao i derivat C15-Ch1 ($\text{IC}_{50}=0.126$) kod koga je fluoro grupa *orto* pozicionirana ostvaruju bolju inhibitornu aktivnost u poređenju sa derivatima kod kojih je prsten A supstituisan hloro (C20-46-Ch27 ($\text{IC}_{50}=0.9860$), C18-Ch5 ($\text{IC}_{50}=1.710$)), metoksi (C17-63-Ch7 ($\text{IC}_{50}=1.690$)) ili metil (C11-51-Ch9 ($\text{IC}_{50}=10.115$)) grupama. Eliminacijom fluoro i uvođenjem hloro grupe slabi elektronegativnost supstituenta, a srazmjerno tome i inhibitorni efekat. Kod C20-46-Ch27 derivata čiji je prsten A 2,6-dihloro supstituisan hloro grupom povoljno utiče na interakcije sa aktivnim mjestom i AspB25 konzerviranom aminokiselinskom sekvencom, aktivnost je slabija zbog slabijeg -I efekta hloro grupe, da bi supstitucijom halogena u prstenu A alkil i alkoksi grupama efekat opao 10 puta u poređenju sa inhibitornim efektima halogenovanih derivata.

Ako se uporede rezultati *in vitro* eksperimenata sa rezultatima *docking* eksperimenata za derivate osnovne strukture III može se zapaziti zadovoljavajuća korelacija. *Docking* eksperimenti su pokazali da je pozicioniranje fluoro derivata u aktivnom mjestu bolje u poređenju sa di i mono hloro, kao i metil i metoksi derivatima. Rezultati *docking* eksperimenata dobijeni za halkan C6-48-Ch4 sa trifluorometil grupom *para* pozicioniranom u prstenu A ne korelišu sa rezultatima *in vitro* ispitivanja. Sprovedeni *docking* eksperimenti su pokazali da trifluorometil grupa kao voluminozna i elektronegativna preko dodatnih halogen interakcija i vodonične veze sa aminokiselinom Asp30 lanca B povoljno utiče na pozicioniranje halkona C6-48-Ch4. *In vitro* ispitivanja su dala rezultate daleko slabije od očekivanih u rangu dihaloro supstituisanog derivata C20-46-Ch27. Kako su u *docking* eksperimentima izuzeti molekuli vode, neusaglašenost rezultata može se objasniti time što se *in vitro* eksperimenti izvode u vodenoj sredini gdje postoji mogućnost građenja vodonične veze fluora sa molekulima vode. Zaokupirani molekulima vode manje su dostupni za interakcije sa aminokiselinama aktivnog mjesta. Efekti vodonične veze vode kao rastvarača i fluoro grupe u halkanima C13-52-Ch6 i C15-Ch1 očigledno ne dolaze do izražaja zbog daleko manje voluminoznosti fluoro grupe. (Tabela 8).

Aktivnost *para* i *orto* fluoriranih derivata osnovne strukture I (C8-22-Ch20 i C2-21-Ch15) identična je njihovim strukturnim analogima, derivatima strukture III, C13-52-Ch6 i C15-Ch1. Inhibitorna aktivnost slabi ukoliko se fluoro grupa supstituiše voluminoznijom trifluorometil grupom (C3-23-Ch16 ($IC_{50} = 0,1093$)), što takođe može da se objasni građenjem vodonične veze sa molekulima vode.

Dodatno uvođenje fluoro grupe u položaj C4 prstena A (C9-54-Ch21) utiče na povećanje inhibitorne aktivnosti (C9-54-Ch21 ($IC_{50} = 0,0104$)) u poređenju sa halkanom C3-23-Ch16, ali neznatno u poređenju sa mono fluoro halkanima C8-22-Ch20 i C2-21-Ch15.

Da aktivnost u poređenju sa mono fluoriranim derivatima značajno raste ukoliko su $-CF_3$ i $-F$ grupe *orto meta* pozicionirane u prstenu A potvrdili su rezultati dobijeni u ispitivanjima inhibitorne aktivnosti derivata osnovne strukture II halkona C1-42-Ch14. Aktivnost ovog jedinjenja je 10 puta veća u poređenju sa halkanom C9-54-Ch21. *In vitro* ispitivanja inhibitorne aktivnosti halkona C1-42-Ch14 potvrdila su rezultate *docking* eksperimenata u kojima je za halkan C1-42-Ch14 potvrđen veliki broj jakih halogen interakcija (GlyA27 iz konzervirane aminokiselinske sekvence, GlyA38, AspA30), kao i dodatne vodonične veze sa AspA29.

Bliskost fluoro i trifluorometil grupe dovodi do superponiranja njihovih efekata, halogen halogen interakcija unutar molekula što smanjuje mogućnost interakcija sa molekulima rastvarača (vode).

Aktivnost mono fluoro derivata osnovne strukture II (C10-26-Ch22 i C4-27-Ch17) je veličine strukturnih analoga derivata osnovnih struktura III i I.

Inhibitorna aktivnost fluoriranih derivata osnovne strukture IV (C14-18-Ch24, C19-19-Ch26 i C12-17-Ch23) ne mijenja se u poređenju sa strukturnim analogima struktura III, I i II.

Eksperimenti sprovedeni sa hloro derivatom strukture IV (C16-14-Ch25) dali su slične rezultate do kojih se došlo u eksperimentima sa hloro derivatima osnovne strukture III kao i rezultatima *docking* eksperimenata.

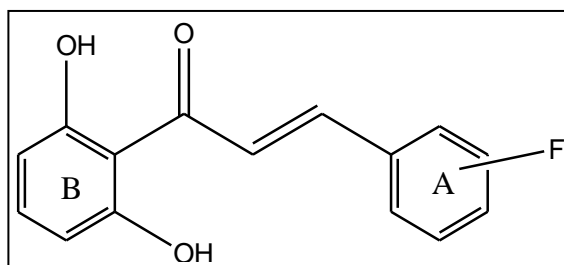
Ako se analiziraju dostupni literaturni podaci vezani za anti-HIV-1 proteaznu aktivnost halkona i uporede sa podacima vezanim za druge biološke aktivnosti (antiproliferativnu,

antimikrobnu, antioksidativnu i sl.) može se reći da je antiviralna aktivnost manje ispitivana i poslednjih godina ovim ispitivanjima se daje na značaju [73-76].

Postoje podaci za anti-HIV proteaznu aktivnost halkona sa metoksi grupom u aromatičnom prstenu izolovanog iz roda *Desmos* ($EC_{50} = 0,022$ g / ml) [76], kao i za strukturnog analoga halkona, polifenolni keton kardamonin, koji je pokazao anti-HIV-1 proteaznu aktivnost sa IC_{50} vrijednošću od 31 g/ml [75].

Rezultati ovog rada dobijeni u *in vitro* i *docking* eksperimentima ukazuju da *orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama, kao i disupstitucija prstena A fluoro grupama doprinose inhibitornoj aktivnosti halkona. Fluor je mali atom koji slično vodoniku ne pravi sternu zaštitu, ali zbog svoje visoke elektronegativnosti doprinosi ostvarivanju jakih halogen interakcija i vodoničnih veza u aktivnom mjestu enzima, pa time i inhibitornom efektu halkona.

Rezultati ukazuju da je osnovna struktura II obećavajuća struktura za modifikacije i istraživanje u području anti-HIV-1 proteazne aktivnosti halkona (Slika 31).



Slika 31. Osnovna struktura za dalje strukturne modifikacije

4.5. Rezultati i diskusija QSAR studije

U cilju identifikacije najvažnijih strukturnih karakteristika koje su odgovorne za anti-HIV-1 proteaznu aktivnost sintetisanih halkona sprovedene su 3D-QSAR studije. Početni data set obuhvatao je 19 novosintetisanih halkona u nejonizovanom i jonizovanom obliku za koje je u *in vitro* studijama određena inhibitorna aktivnost (anti-HIV-1 proteazna aktivnost). Sve strukture su prethodno optimizovane i podijeljene u trening (26) i test (12) setove. Trening set je korišćen za formiranje QSAR modela, a test set je korišćen za eksternu validaciju. Za formiranje QSAR modela korišćena je PLS regresiona analiza.

Izračunavanjem GRIND deskriptora iz molekulskih polja interakcija započeto je formiranje 3D-QSAR modela. Kao nezavisno promjenljive vrijednosti (x) korišćeni su molekulski deskriptori, dok je zavisno promjenljiva (y) predstavljala negativan dekadni logaritam inhibitorne aktivnosti halkona (pIC_{50}). Inicijalni broj deskriptora redukovana je upotrebom FFD algoritma. Kao rezultat predložen je model sa 4 latentne varijable ($LV = 4$) ili značajne komponente. Statistički parametri modela i rezultati eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti za sva jedinjenja iz data seta prikazani su u tabelama 18 i 19.

Tabela 18. Statistički parametri interne i eksterne validacije

Parametri interne validacije		
Parametri	Vrijednosti	Limiti
R^2	0,910	> 0,7
Q^2	0,550	> 0,5
RMSEE	0,564	/
$R^2_{obs/pred}$	0,900	/
Parametri eksterne validacije		
Parametri	Vrijednosti	Limiti
R^2_{pred}	0,677	>0,5
RMSEP	0,871	$\leq 2RMSEE$
r^2_m	0,645	> 0,5
r'^2_m	0,719	> 0,5
Δr^2_m	-0,074	< 0,2
\bar{r}^2_m	0,682	> 0,5
$(r^2 - r_0/2)/r^2$	0,007	<0,1
k'	0,988	$0,85 < k' < 1,15$

Vrijednosti statističkih parametara $R^2 = 0,91$; $Q^2 = 0,55$; $RMSEE = 0,564$; $RMSEP = 0,871$; $R^2_{pred} = 0,677$ potvrđuju da formirani 3D-QSAR model ima dobru moć predviđanja i da se kao takav može primijeniti u dizajniranju novih jedinjenja sa boljom inhibitornom aktivnošću. Parametri r^2_m , r'^2_m , r_m^2 (vrijednost veća od 0,5) i parametar Δr^2_m (vrijednost manja od 0,2) kao parametri čije vrijednosti predstavljaju najstrožiji kriterijum eksterne validacije dodatno potvrđuju kvalitet formiranog modela.

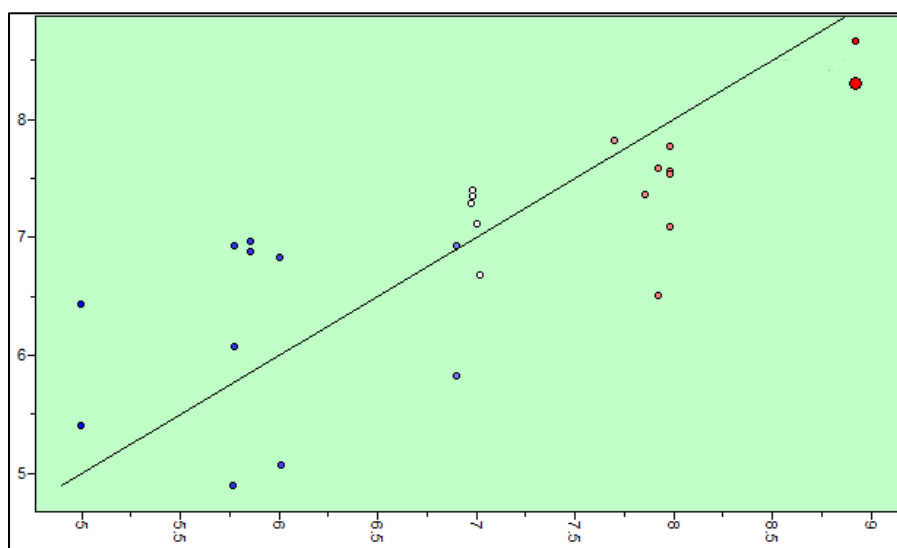
Tabela 19. Eksperimentalne i predviđene vrijednosti

Trening set			
Jedinjenje	Eksperim. aktivnost	Pred. aktivnost	Rezidue
C1-42-Ch14 nejonizovan	8,921	8,829	0,092
C1-42-Ch14 jonizovan	8,921	8,720	0,201
C9-54-Ch21 jonizovan	7,983	7,788	0,195
C9-54-Ch21 nejonizovan	7,983	8,099	-0,116
C14-18-Ch24 nejonizovan	7,983	7,904	0,079
C14-18-Ch24 jonizovan	7,983	7,956	0,027
C13-52-Ch6 nejonizovan	7,921	7,437	0,484
C13-52-Ch6 jonizovan	7,921	8,044	-0,123
C8-22-Ch20 jonizovan	7,854	7,894	-0,04
C19-19-Ch26 jonizovan	7,699	7,862	-0,163
C7-20-Ch19 jonizovan	7,018	6,695	0,323
C12-17-Ch23 nejonizovan	7,004	7,035	-0,031
C2-21-Ch15 jonizovan	6,983	7,160	-0,177
C2-21-Ch15 nejonizovan	6,983	7,236	-0,253
C4-27-Ch17 nejonizovan	6,974	6,860	0,114
C15-Ch1 nejonizovan	6,900	7,077	-0,177
C15-Ch1 jonizovan	6,900	6,119	0,781
C20-46-Ch27 nejonizovan	6,006	5,663	0,343
C6-48-Ch4 jonizovan	6,005	6,358	-0,353
C16-14-Ch25 nejonizovan	5,853	5,761	0,092
C16-14-Ch25 jonizovan	5,853	6,262	-0,409
C17-63-Ch7 nejonizovan	5,772	6,296	-0,524
C17-63-Ch7 jonizovan	5,772	5,861	-0,089
C18-Ch5 nejonizovan	5,767	5,289	0,478
C11-51-Ch9 jonizovan	4,995	4,887	0,108
C11-51-Ch9 nejonizovan	4,995	5,854	-0,859

Test set			
Jedinjenje	Eksperim. aktivnost	Pred. aktivnost	Rezidue
C10-26-Ch22 jonizovan	7,983	8,563	-0,580
C10-26-Ch22 nejonizovan	7,983	8,105	-0,122
C8-22-Ch20 nejonizovan	7,854	8,372	-0,518
C19-19-Ch26 nejonizovan	7,699	8,380	-0,681
C7-20-Ch19 nejonizovan	7,018	6,535	0,483
C12-17-Ch23 jonizovan	7,004	7,637	-0,633
C4-27-Ch17 jonizovan	6,974	7,101	-0,127
C3-23-Ch16 nejonizovan	6,961	6,878	0,083
C3-23-Ch16 jonizovan	6,961	7,333	-0,372
C20-46-Ch27 jonizovan	6,006	6,373	-0,367
C6-48-Ch4 nejonizovan	6,005	7,095	-1,090
C18-Ch5 jonizovan	5,767	5,987	-0,220

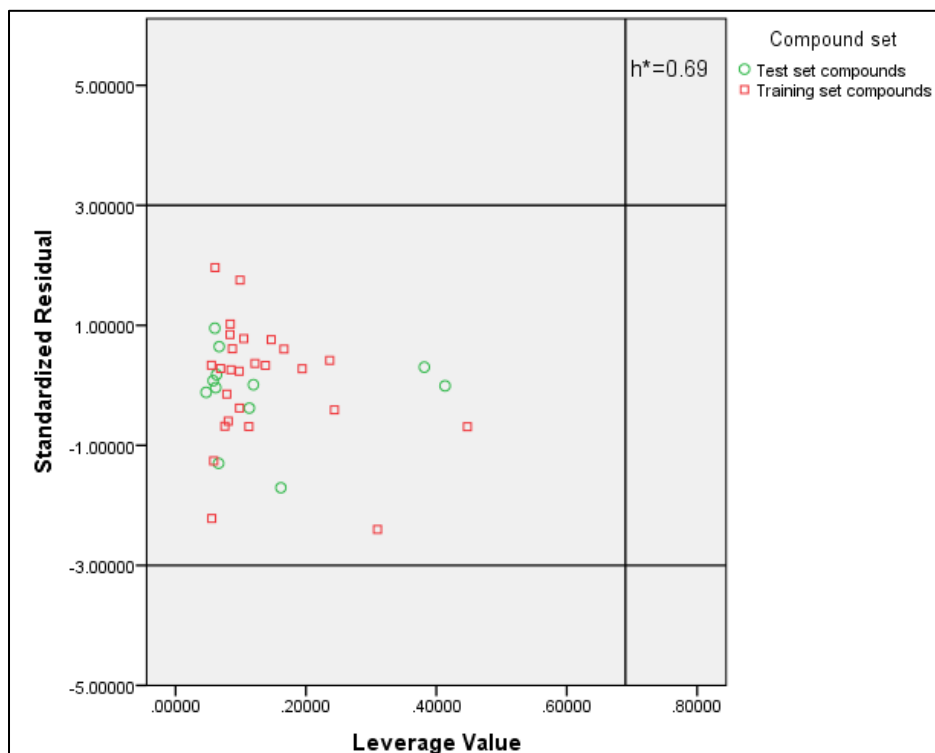
Rezultati prikazani u tabeli 19 ukazuju da je formirani 3D-QSAR model sa visokim stepenom pouzdanosti predvidio aktivnost jedinjenja iz data seta. Predviđene pIC₅₀ vrijednosti nisu odstupale više od jedne logaritamske jedinice.

Grafički prikaz korelacije eksperimentalnih i modelom predviđenih aktivnosti prikazan je na slici 32.



Slika 32. Grafik eksperimentalnih (x) i predviđenih (y) aktivnosti

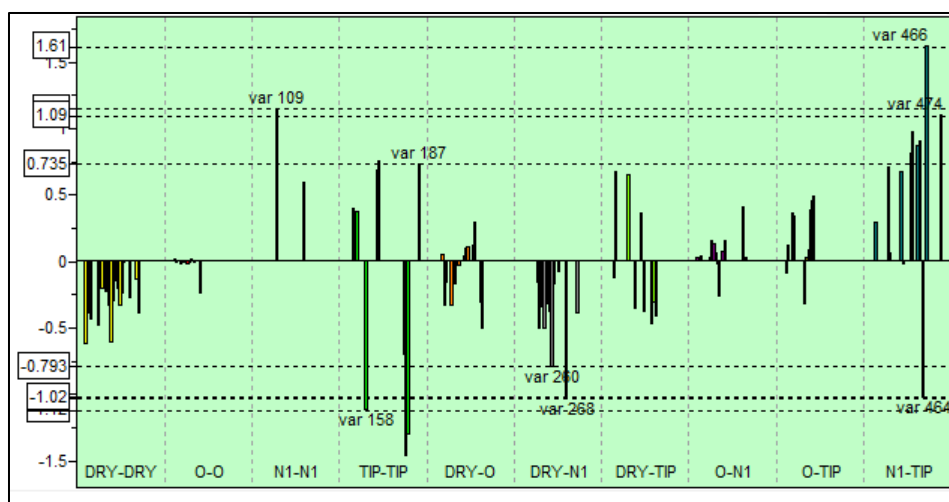
Domen primjenljivosti formiranog 3D-QSAR modela je razvijen primjenom *leverage* pristupa kojim se ispituje da li se podaci dobijeni za ispitivana jedinjenja nalaze u definisanom hemijskom prostoru. *Leverage* vrijednosti trening i test set jedinjenja u odnosu na standardizovane rezidue (razlike između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti (Tabela 19) prikazane su na Williams-ovom grafiku (Slika 33).



Slika 33. Domen primjenljivosti formiranog 3D-QSAR modela

Za konstrukciju grafika odabrano je pet varijabli (v466, v109, v474, v158, v268) sa najvišim PLS koeficijentom (Slika 33). Dobijeni grafikon pokazuje da se sva jedinjenja iz trening i test seta uklapaju unutar definisanih granica i da ne postoje vrijednosti koje „iskaču“.

Varijable koje optimalno opisuju kreirani model sa njihovim PLS koeficijentima prikazane su na histogramu (Slika 34).



Slika 34. Histogram PLS koeficijenata GRIND varijabli

Odabrane varijable, koje imaju najveći uticaj na inhibitornu aktivnost i njihovi opisi prikazani su u tabelama 20 i 21.

Tabela 20. Najvažnije GRIND varijable sa pozitivnim uticajem na inhibitornu aktivnost

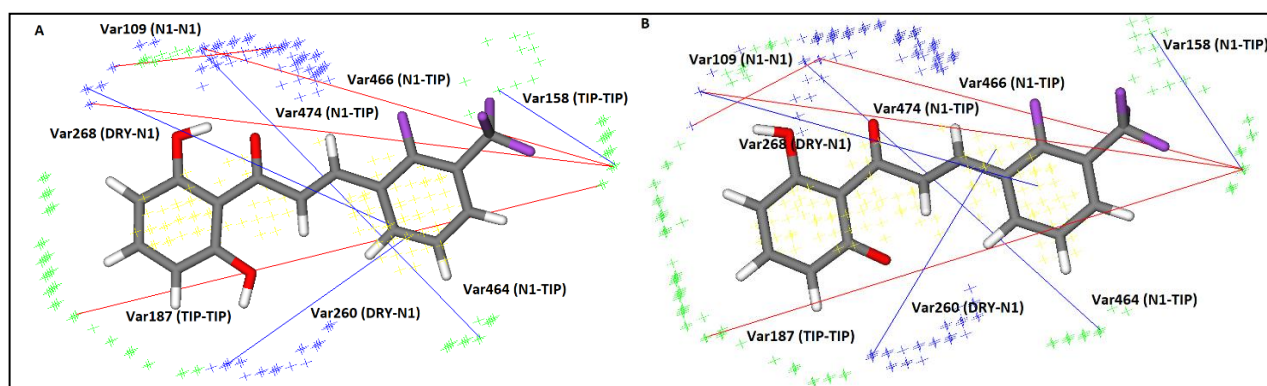
Varijable	Tip	Distanca [Å]	Opis	PLS koeficijent
v466	N1-TIP	13,60 – 14,00	Ova varijabla ima najjači pozitivni uticaj na inhibitornu aktivnost. Predstavlja udaljenost između keto grupe kao akceptora vodonične veze i sternog centra na benzenovom prstenu A (vodonik ili supstituent). Izražena je kod većine aktivnih jedinjenja.	1,6123
v109	N1-N1	5,20 – 5,60	Optimalna udaljenost fenolnih i keto grupa kao akceptora vodonične veze. Izražena je pretežno u nejonizovanim oblicima.	1,1458
v474	N1-TIP	16,80 – 17,20	Povoljna udaljenost između fenola / fenolata kao akceptora vodonične veze i sternog centra na benzenovom prstenu A (vodonik ili supstituent). Izražena samo kod nekoliko jedinjenja sa najvećom aktivnošću.	1,0940
v187	TIP-TIP	17,20 – 17,60	Rastojanje između supstituenata na benzenovim prstenovima A i B koji predstavljaju sterna mjesta dva prstena.	0,7351

Tabela 21. Najvažnije GRIND varijable sa negativnim uticajem na inhibitornu aktivnost

Varijabla	Tip	Distanca [Å]	Opis	PLS koeficijent
v158	TIP-TIP	5,60 – 6,00	Nepovoljno rastojanje između dva sterna centra na benzenovom prstenu A, sa izuzetkom halkona C1-42-Ch14.	-1,1213
v268	DRY-N1	11,20 – 11,60	Rastojanje fenolne grupe kao akceptora vodonične veze i benzenovog prstena A (hidrofobni centar) sa negativnim uticajem na aktivnost.	-1,0302
v464	N1-TIP	12,80 – 13,2	Varijabla formirana između keto grupe kao akceptora vodonične veze i supstituenta u položaju <i>meta</i> / <i>para</i> na benzenovom prstenu A.	-1,0226
v260	DRY-N1	8,00 – 8,40	Rastojanje između keto grupe kao akceptora vodonične veze i benzenovog prstena A kao hidrofobnog centra.	-0,7926

Sve najvažnije pozitivne i negativne varijable prisutne su kod jedinjenja C1-42-Ch14 ($pIC_{50} = 8,921$) sa najvećom inhibitornom aktivnošću. Varijabla v474 i v466 (N1-TIP) koja se formira između trifluorometil grupe kao sternog centra na benzenovom prstenu A i fenolne / fenolatne i keto grupe, kao akceptora vodoničnih veza, pozitivno utiče na aktivnost. Optimalna udaljenost između trifluorometil grupe i vodonika u *para* položaju na benzenovom prstenu B, opisana varijablom v187 (TIP-TIP), doprinosi aktivnosti ovog jedinjenja. Varijabla v109 (N1-N1) koja se formira između fenolne / fenolatne i keto grupe kao akceptora vodonične veze pokazuje pozitivan uticaj na aktivnost kod svih jedinjenja data seta (Slika 35. A).

Negativan uticaj na inhibitornu aktivnost jedinjenja C1-42-Ch14 pokazuje rastojanje između dva fluora, kao sterna centra, unutar trifluorometil grupe, što je definisano varijablom v158 (TIP-TIP). Rastojanja između fenolne ili keto grupe kao akceptora vodonične veze i benzenovog prstena A (hidrofobna grupa) nepovoljno utiče na aktivnost halkona C1-42-Ch14 (v250 i v256 (N1-DRY)). Neadekvatno rastojanje keto grupe, kao akceptora vodonične veze i vodonika u *meta* položaju u benzenovom prstenu A kao sterna centar (v464: N1-TIP) nepovoljno utiče na aktivnost halkona C1-42-Ch14 (Slika 35. B).

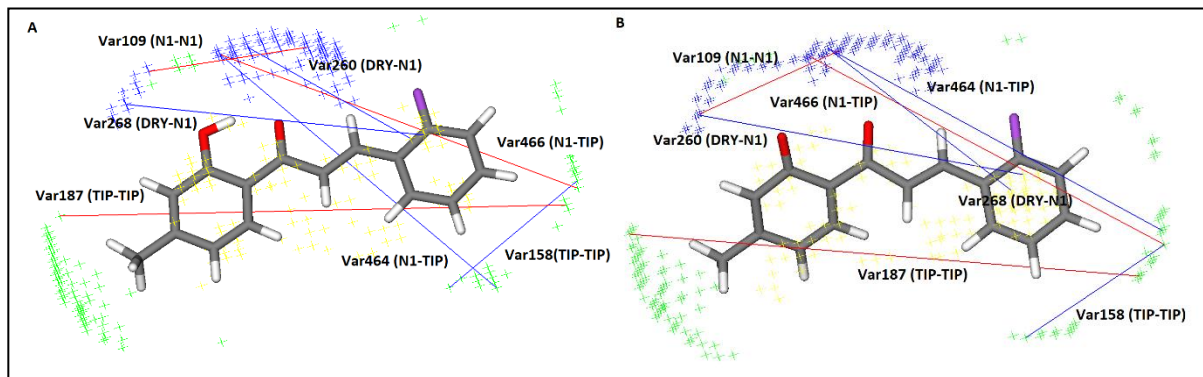


Slika 35. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja C1-42-Ch14: **A)** nejonizovani i **B)** jonizovani oblik. Varijable sa pozitivnim uticajem na inhibitornu aktivnost prikazane su linijama crvene boje. Varijable sa negativnim uticajem na inhibitornu aktivnost prikazane su linijama plave boje.

Kod jedinjenja C2-21-Ch15 ($pIC_{50} = 6.983$), sa umjerenom inhibitornom aktivnošću varijabla v466 (N1-TIP) koja predstavlja udaljenost između keto grupe kao akceptora vodonične veze i vodonika u *para* položaju na benzenovom prstenu A kao sternog centra povoljno utiče na inhibitornu aktivnost. Varijabla v474 (N1-TIP), koja definiše rastojanje između fenola / fenolata kao akceptora vodonične veze i sternog centra na benzenovom prstenu A (vodonik ili supstituent), nije prisutna kod jedinjenja C2-21-Ch15 što bi moglo da ukazuje na značaj voluminoznosti supstituenta u *meta* / *para* položaju benzenovog prstena A. Povoljan uticaj na aktivnost pokazuje optimalno rastojanje između fenolne i keto grupe (v109 (N1-N1)) kao akceptora vodonične veze, kao i rastojanje između metil grupe benzenovog prstena B i vodonika benzenovog prstena A kao dva sterna centra (v187 (TIP-TIP)) (Slika 36. A). Sve varijable sa negativnim uticajem na aktivnost formiraju se i u oba

oblika jedinjenja C2-21-Ch15. Rastojanje na kome se nalaze keto i fenolna / fenolatna grupa kao akceptori vodonične veze (v109) negativno utiče na aktivnost jedinjenja, kao i rastojanja između benzenovog prstena A (hidrofobni centar) i fenolne / fenolatne ili keto grupe kao akceptora vodonične veze (v260 i v268). Iako je u prstenu A molekula C2-21-Ch15 u *orto* položaju prisutna fluoro grupa, keto grupa kao akceptor vodonične veze ostvaruje interakciju sa vodonikovim atomom u *para* položaju prstena A (v464 (N1-TIP)) što nepovoljno utiče na aktivnost jedinjenja C2-21-Ch15 (Slika 36. B).

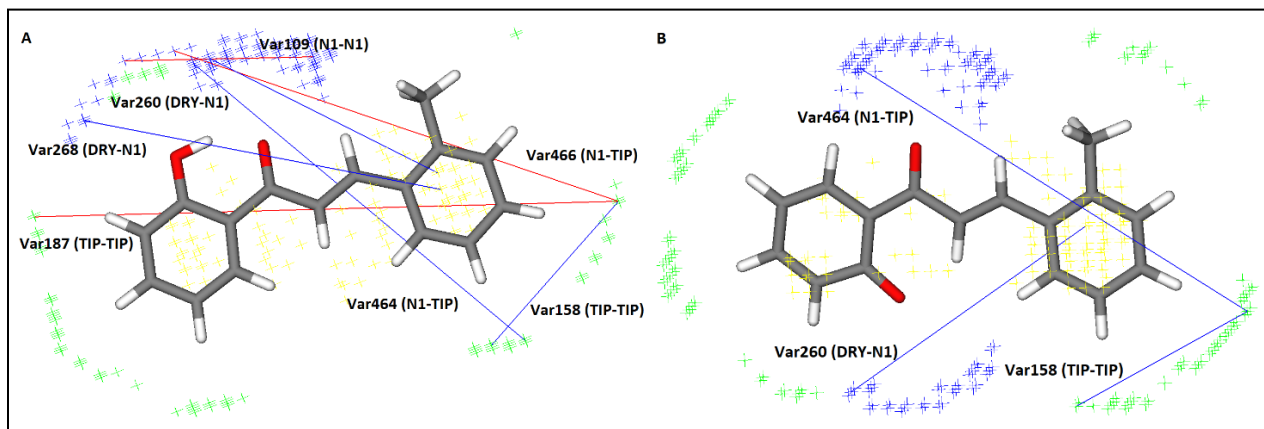
Oba oblika C2 imaju formirane sve negativne varijable, kao i u ostatku skupa podataka.



Slika 36. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja C2-21-Ch15: **A)** nejonizovani i **B)** jonizovani oblik. Varijable sa pozitivnim uticajem na inhibitornu aktivnost prikazane su linijama crvene boje. Varijable sa negativnim uticajem na inhibitornu aktivnost prikazane su linijama plave boje.

Kod jedinjenja C11-51-Ch9, koje je u *in vitro* uslovima pokazalo najslabiju inhibitornu aktivnost ($pIC_{50} = 4,995$) u nejonizovanom obliku formiraju se 3 od 4 varijable sa pozitivnim uticajem na inhibitornu aktivnost: varijabla v466 (N1-TIP) koja se formira između keto grupe kao akceptora vodonične veze i vodonika u *para* položaju benzenovog prstena, kao sternog centra; varijabla v109 (N1-N1) koja se formira između dva akceptora vodonične veze (fenolne i keto grupe) i varijabla v187 koja se formira između vodonika u *meta* položaju prstena B i vodonika u *para* položaju prstena A kao dva sterna centra (Slika 37. A). Kada se jedinjenje C11-51-Ch9 nalazi u jonizovanom obliku ne dolazi do formiranja nijedne od varijabli sa pozitivnim uticajem na inhibitorni efekat (Slika 37. B).

Sve varijable koje negativno utiču na inhibitorni efekat halkona iz data seta formiraju se kod jedinjenja C11-51-Ch9 kada se ono nalazi u nejonizovanom obliku. Na inhibitorni efekat jedinjenja C11-51-Ch9 nepovoljno utiče rastojanje dva vodonikova atoma u *meta* i *para* položaju na benzenovom prstenu B (v158 (TIP-TIP)), udaljenost fenolne i keto grupe od benzenovog prstena B (v260 i v268 (N1-DRY)), kao rastojanje fenolne grupe i vodonika u *para* položaju prstena B (v464 (N1-TIP)). Ako se jedinjenje C11-51-Ch9 nađe u jonizovanom obliku izostaje formiranje varijable v268 (N1-DRY) (Slika 37. B).



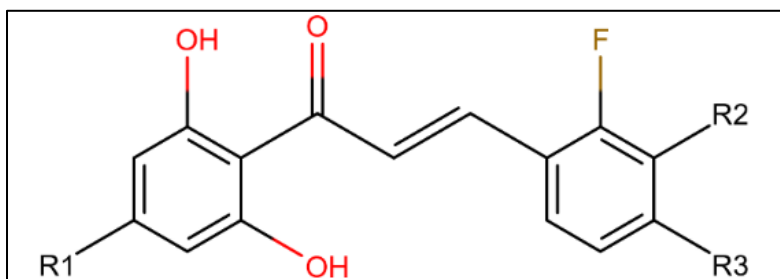
Slika 37. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja C11-51-Ch9: **A)** nejonizovani i **B)** jonizovani oblik. Varijable sa pozitivnim uticajem na inhibitornu aktivnost prikazane su linijama crvene boje. Varijable sa negativnim uticajem na inhibitornu aktivnost prikazane su linijama plave boje

Na osnovu rezultata 3D-QSAR studije sintetisanih halkona mogu se izdvojiti varijable koje među pozitivnim varijablama pokazuju najveći uticaj na aktivnost jedinjenja: v187 (TIP-TIP) koja definiše rastojanje između supstituenata na benzenovim prstenovima A i B, varijabla v466 (N1-TIP) koja definiše udaljenost između keto grupe kao akceptora vodonične veze i sternog centra na benzenovom prstenu A (vodonik ili supstituent).

Varijable koje optimalno opisuju kreirani model formiraju se gotovo kod svih jedinjenja data seta u jonizovanom i nejonizovanom obliku, ali sa razlikama koje su kvantitativne prirode (vrijednosti varijabli) (Tabela 20). Ipak, tri varijable (v466 (N1-TIP), v187 (TIP-TIP) i v158 (TIP-TIP)) ukazuju na moguće strukturne modifikacije u cilju dizajniranja aktivnijih jedinjenja.

Najaktivnije jedinjenje iz data seta (C1-42-Ch14) poslužilo je kao *lead* jedinjenje za dizajniranje novih derivata halkona koji bi pokazivali bolju inhibitornu aktivnost prema HIV-1 proteazi. U dizajniranju su upotrijebljene dvije strategije:

1. Supstitucija sternog centra, vodonikovog atoma u *para* položaju prstena B koji učestvuje u formiranju pozitivne varijable v187 (TIP-TIP) (R_1 supstituent - Slika 38).
2. Modifikacija trifluorometil grupe koja učestvuje u formiranju pozitivnih varijabli v187 (TIP-TIP) i v466 (N1-TIP). Modifikacija podrazumijeva promjenu položaja ili / i supstituciju trifluorometil grupe, grupama koje će potencirati formiranje pozitivnih varijabli (v187 (TIP-TIP) i v466 (N1-TIP)), ali istovremeno spriječiti formiranje varijable v158 (TIP-TIP) sa negativnim uticajem na aktivnost (supstituent R_2 i R_3 , Slika 38).



Slika 38. Opšta struktura dizajniranih derivata halkona

Primjenom obje strategije, pojedinačno ili u kombinaciji, dizajnirane su nove strukture koje pokazuju dobru prediktivnu aktivnost (Tabela 22):

Tabela 22. Derivati halkona dizajnirani primjenom: strategije 1, strategije 2 i kombinacijom dvije strategije

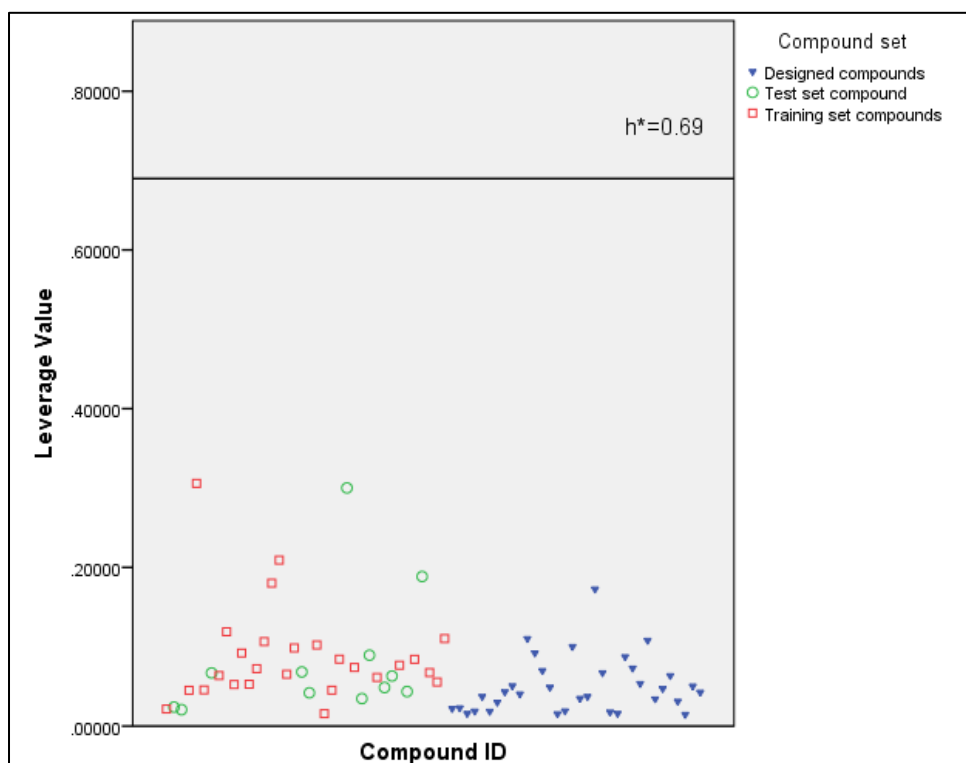
	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃
Strategija 1	D1	-CH ₃	-CF ₃	-H
	D2	-F	-CF ₃	-CH ₃
	D3	-CH ₂ CH ₃	-CF ₃	-CH ₃
	D4	-CH(CH ₃) ₂	-CF ₃	-H
	D5	-Cl	-CF ₃	-H
	D6	-CF ₃	-CF ₃	-H
	D7	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-CF ₃	-H
	D8	-NH ₂	-H	-CH ₃
	D9	-NHCH ₃	-H	-CH ₃
Strategija 2	E1	-H	-CH ₂ F	-H
	E2	-H	-H	-CF ₃
	E3	-H	-H	-F
	E4	-H	-H	-CH ₃
Strategija 3 (Kombinacija)	F1	-F	-CH ₂ F	-H
	F2	-F	-H	-CF ₃
	F3	-F	-H	-F
	F4	-F	-H	-CH ₃

Dizajnirane strukture (Tabela 22) su pripremljene po istom postupku kao jedinjenja iz data seta, a njihove aktivnosti su predviđene kreiranim 3D-QSAR modelom. Aktivnosti nejonizovanih i jonizovanih oblika dizajniranih jedinjenja predstavljene su u tabeli 23.

Tabela 23. Predviđene aktivnosti dizajniranih halkona

Strategija 1			
Jedinjenje	Aktivnost	Jedinjenje	Aktivnost
D1 nejonizovan	8,825	D5 nejonizovan	9,462
D1 jonizovan	9,608	D5 jonizovan	9,668
D2 nejonizovan	10,646	D6 nejonizovan	8,945
D2 jonizovan	9,915	D6 jonizovan	9,028
D3 nejonizovan	9,136	D7 nejonizovan	8,402
D3 jonizovan	9,083	D7 jonizovan	9,145
D4 nejonizovan	9,118	D8 nejonizovan	9,853
D4 jonizovan	9,167	D8 jonizovan	9,481
D9 nejonizovan	9,453	D9 jonizovan	9,352
Strategija 2		Strategija 3	
Jedinjenje	Aktivnost	Jedinjenje	Aktivnost
E1 nejonizovan	8,169	F1 nejonizovan	9,035
E1 jonizovan	8,937	F1 jonizovan	9,140
E2 nejonizovan	8,998	F2 nejonizovan	9,689
E2 jonizovan	8,151	F2 jonizovan	9,953
E3 nejonizovan	9,684	F3 nejonizovan	10,599
E3 jonizovan	8,190	F3 jonizovan	11,263
E4 nejonizovan	8,547	F4 nejonizovan	9,053
E4 jonizovan	8,630	F4 jonizovan	9,684

Kako bi potvrdili da li se dizajnirane strukture uklapaju u prethodno definisani hemijski prostor upotrijebili smo *leverage* pristup (Slika 39).



Slika 39. Oblast primjenljivosti trening, test i dizajniranih jedinjenja

Podaci dobijeni za sve dizajnirane strukture nalaze se unutar definisanog domena primjenljivosti kreiranog 3D-QSAR modela.

Primjenom programa *ADMET predictor* za jedinjenja data seta, kao i za dizajnirana jedinjenja izračunate su ADMET osobine u cilju odabira jedinjenja sa povoljnim farmakokinetičkim profilom, kao potencijalnih kandidata za buduće lijekove.

Rezultati predviđenih vrijednosti ADMET osobina prikazani su u tabelama 24 i 25.

Tabela 24. Vrijednosti odabranih ADMET osobina za sintetisana jedinjenja

Jedinjenje	ADMET_Rizik	BBB_Filter	hum_fup%	Pgp_Supst	RuleOf5	CYP_Rizik	hERG_Filter	MUT_Rizik	TOX_Rizik
C1-42-Ch14	5,000	Visok	4,627	Ne	0	2,000	Ne	0,9	1
C2-21-Ch15	5,110	Visok	4,268	Ne	1	3,000	Da	0,9	0
C3-23-Ch16	5,034	Visok	3,781	Ne	1	2,613	Da	0,9	0
C4-27-Ch17	2,847	Visok	4,622	Ne	0	1,253	Ne	0,9	0
C6-48-Ch4	4,205	Visok	3,732	Ne	1	2,205	Da	0,9	0
C7-20-Ch19	3,407	Visok	4,085	Ne	1	1,354	Ne	0,6	0
C8-22-Ch20	5,493	Visok	4,176	Ne	1	3,000	Da	0,9	0
C9-54-Ch21	5,732	Visok	4,421	Ne	1	2,975	Da	0,9	0
C10-26-Ch22	4,000	Visok	4,064	Ne	0	2,000	Ne	0,9	0
C11-51-Ch9	4,780	Visok	4,202	Ne	0	3,000	Da	0,9	0
C12-17-Ch23	3,696	Visok	4,526	Ne	1	1,696	Ne	0,9	0
C13-52-Ch6	4,518	Visok	4,311	Ne	1	2,471	Ne	0,9	0
C14-18-Ch24	3,806	Visok	4,414	Ne	1	1,806	Ne	0,9	0
C15-Ch1	4,734	Visok	4,226	Ne	0	3,000	Ne	0,9	0
C16-14-Ch25	5,493	Visok	3,624	Ne	1	2,000	Da	0,6	1
C17-63-Ch7	2,744	Visok	4,044	Ne	0	2,271	Da	0,9	0
C18-Ch5	5,945	Visok	3,703	Ne	1	3,000	Da	1,2	1
C19-19-Ch26	3,296	Visok	4,328	Ne	1	1,296	Ne	0,9	0
C20-46-Ch27	6,338	Visok	3,411	Ne	1	3,000	Da	1,2	1

ADMET_Rizik - opšti model ADMET rizika; BBB_Filter - vjerovatnoća prolaska kroz krvno-moždanu barijeru; hum_fup% - procenat nevezanog lijeka u plazmi; Pgp_Subst – interakcije sa P-glikoproteinom; RuleOf5 - Lipinski "Rule of Five"; CYP_Rizik – oksidacija preko citohroma P450; hERG_Filter - inhibicije hERG kalijumovih kanala; MUT_Rizik - vjerovatnoća mutagenosti kod bakterija kao i potencijalne kancerogenosti; TOX_Risk – vjerovatnoća potencijalne toksičnosti.

Tabela 25. Vrijednosti odabranih ADMET osobina za dizajnirana jedinjenja

Jedinjenje	ADMET_Rizik	BBB_Filter	hum_fup%	Pgp_Supst	RuleOf5	CYP_Rizik	hERG_Filter	MUT_Rizik	TOX_Rizik
C1-42-Ch14 (lead jedinjenje)	5,000	Visok	4,627	Ne	0	2,000	Ne	0,9	1
D1	4,179	Visok	4,753	Ne	1	2,368	Ne	0,9	0
D2	3,352	Visok	4,940	Ne	1	2,168	Ne	0,9	0
D3	3,726	Visok	4,053	Ne	1	1,462	Ne	0,9	0
D4	4,429	Visok	3,742	Ne	1	1,756	Ne	0,9	0
D5	4,461	Visok	4,415	Ne	1	2,000	Da	0,6	1
D6	2,110	Visok	4,618	Ne	0	1,480	Ne	0,9	0
D7	4,859	Visok	4,305	Ne	1	2,000	Ne	0,9	0,595
D8	5,846	Visok	3,948	Ne	1	3,000	Ne	0,9	0
D9	3,185	Visok	4,527	Ne	0	1,000	Ne	0,9	1
E1	1,790	Visok	4,899	Ne	0	1,042	Ne	0,9	0
E2	2,335	Visok	4,457	Ne	0	1,370	Ne	0,9	0
E3	3,268	Nizak	5,140	Ne	0	1,020	Ne	0,9	1
E4	3,445	Nizak	4,469	Ne	0	1,468	Ne	0,9	0
F1	2,331	Visok	4,850	Ne	0	1,572	Ne	0,9	0
F2	3,000	Visok	4,748	Ne	1	2,000	Ne	0,9	0
F3	4,134	Visok	5,109	Ne	0	1,253	Ne	1,5	2
F4	2,443	Visok	4,667	Ne	0	1,443	Ne	0,9	0

ADMET_Rizik - opšti model ADMET rizika; BBB_Filter - vjerovatnoća prolaska kroz krvno-moždanu barijeru; hum_fup% - procenat nevezanog lijeka u plazmi; Pgp_Subst – interakcije sa P-glikoproteinom; RuleOf5 - Lipinski "Rule of Five"; CYP_Rizik – oksidacija preko citohroma P450; hERG_Filter - inhibicije hERG kalijumovih kanala; MUT_Rizik - vjerovatnoća mutagenosti kod bakterija kao i potencijalne kancerogenosti; TOX_Risk – vjerovatnoća potencijalne toksičnosti.

Od jedinjenja iz data seta, jedinjenja: C1-42-Ch14, C4-27-Ch17, C10-26-Ch22, C11-51-Ch9, C15-Ch1 i C17-63-Ch7 su zadovoljila sva pravila Lipinskog.

Nijedno od sintetisanih jedinjenja nije supstrat za glikoprotein P, ali je za jedinjenja: C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C6-48-Ch4, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21, C11-51-Ch9, C16-14-Ch25, C17-63-Ch7, C18-Ch5 i C20-46-Ch27 predviđeno da pokazuju kardiotsičan efekat vezivanjem za hERG kalijumove kanale.

Rizik koji može nastati metaboličkom oksidacijom preko oksidaza iz grupe CYP450 daleko je manji kod jedinjenja: C4-27-Ch17, C7-20-Ch19, C12-17-Ch23, C14-18-Ch24 i C19-19-Ch26 u poređenju sa ostalim sintetisanim halkanima iz data seta.

Kao mogući kancerogeni izdvajaju se jedinjenja: C18-Ch5 i C20-46-Ch27 sa nešto većim vrijednostima za *MUT_Rizik* (1,2).

Analizom rezultata dobijenih za dizajnirana jedinjenja i poređenjem sa rezultatima dobijenim za najaktivnije jedinjenje C1-42-Ch14 može se uočiti sljedeće:

- Dizajnirana jedinjenja kao i *lead* jedinjenje C1-42-Ch14 nisu supstrati za PGP.
- Rizik od oksidacije enzimima iz grupe *CYP450* za jedinjenja: D1, D2 i D8 je veći u odnosu na *lead* jedinjenje.
- Potencijalna koncerogenost (*MUT_Rizik*), kao i toksičnost (*TOX_Rizik*) daleko je manja kod dizajniranih jedinjenja, sa izuzetkom jedinjenja F3.
- Kardiotsičnost dizajniranih jedinjenja nije predviđena sa izuzetkom jedinjenja D5.
- Za razliku od *lead* jedinjenja, jedinjenja: D1, D2, D3, D4, D5, D7, D8 i F2 ne zadovoljavaju sva pravila po Lipinskom.
- Na osnovu predviđenih ADMET osobina dizajnirana jedinjenja: D6, D9, E1, E2, E3, E4, F1 i F4 su izdvojena kao potencijalni kandidati za buduću sintezu i biološka ispitivanja.

4.6. Rezultati i diskusija ispitivanja redoks aktivnosti derivata propiofenona

Kako bi se procijenio uticaj novosintetisanih halkona na redoks status serumskog pula, određivan je totalni antioksidativni status (TAS) u prisustvu ispitivanih halkona i to bez i sa dodatim TBH. Rezultati su prikazani u tabeli 26.

Tabela 26. Vrijednosti totalnog antioksidativnog statusa (TAS, u $\mu\text{mol/l}$) u uzorcima različitih koncentracija antioksidanasa

Oznaka halkona	TAS	p1	TAS-TBH	p2
C20-46-Ch27 (1)	564 (537 - 591)	18-30 (p<0,001)	507 (498 - 516)	4, 18-30 (p<0,001)
C25-12-Ch30 (2)	495 (494 - 496)	18-30 (p<0,001)	598 (525 - 670)	4, 7 (p=0,039), 13(p=0,01), 18-30 (p<0,001)
C22-13-Ch29 (3)	456 (438 - 474)	18-30 (p<0,001)	572 (512 - 631)	4, 13 (p=0,028), 18-30 (p<0,001)
C16-14-Ch25 (4)	448 (436 - 461)	18-30 (p<0,001)	115 (88 - 142)	4-6, 8, 10, 12, 14-30 (p<0,001)
C21-16-Ch28 (5)	372 (328 - 417)	9,11 (p=0,032), 18-30 (p<0,001)	612 (548 - 675)	4, 7 (p=0,023), 13, 18-30 (p<0,001)
C12-17-Ch23 (6)	372 (344 - 401)	9,11 (p=0,032), 18-30 (p<0,001)	614 (587 - 641)	4, 7 (p=0,021), 13, 18-30 (p<0,001)
C19-19-Ch26 (7)	372 (347 - 396)	9, 11 (p=0,031), 18-30 (p<0,001)	322 (284 - 359)	2 (p=0,039), 5 (p=0,023), 6 (p=0,021), 10 (p=0,044), 14 (p=0,019), 18-30 (p<0,001)
C7-20-Ch19 (8)	415 (407 - 422)	9 (p=0,024), 18- 30 (p<0,001)	573 (572 - 573)	4,13 (p=0,027), 18-30 (p<0,001)
C2-21-Ch15 (9)	665 (654 - 675)	5-7, 8 (p=0,024), 10, 12 (p=0,016), 18-30 (p<0,001)	350 (229 - 470)	18-30 (p<0,001)
C8-22-Ch20 (10)	361 (340 - 382)	9, 11 (p=0,020), 18-30 (p<0,001)	595 (573 - 616)	4, 7 (p=0,044), 13 (p=0,012), 18-30 (p<0,001)
C3-23-Ch16 (11)	616 (608 - 623)	5 (p=0,032), 6 (p=0,032), 7 (p=0,031), 10 (p=0,020), 18-30 (p<0,001)	384 (338 - 430)	4, 18-30 (p<0,001)
C9-54-Ch21 (12)	405 (397 - 413)	9 (p=0,016), 18-30 (p<0,001)	495 (459 - 530)	4, 18-30 (p<0,001)

C10-26-Ch22 (13)	459 (390 – 528)	18-30 (p<0,001)	286 (159 - 413)	2 (p=0,010), 3 (p=0,028), 5, 6, 8 (p=0,027), 10 (p=0,012), 14, 15 (p=0,021), 16 (p=0,042), 18-30 (p<0,001)
C1-42-Ch14 (14)	481 (353 - 609)	18-30 (p<0,001)	617 (594 - 640)	4, 7 (p=0,019), 13, 18-30 (p<0,001)
C4-27-Ch17 (15)	585 (509 - 661)	18-30 (p<0,001)	579 (492 - 665)	4, 13 (p=0,021), 18-30 (p<0,001)
C5-32-Ch18 (16)	490 (447 - 533)	18-30 (p<0,001)	560 (534 - 586)	4,13 (p=0,042), 18-30 (p<0,001)
C14-18-Ch24 (17)	487 (448 - 525)	18-30 (p<0,001)	539 (535 - 543)	4, 18-30 (p<0,001)
C15-Ch1 (18)	1237 (1174 - 1299)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1275 (1269 - 1280)	1-17, 28-30 (p<0,001)
65-Ch2 (19)	1250 (1225 - 1275)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1308 (1266 - 1350)	1-17, 28-30 (p<0,001)
Ch3 (20)	1285 (1283 - 1287)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1313 (1299 - 1327)	1-17, 28-30 (p<0,001)
C6-48-Ch4 (21)	1254 (1230 - 1278)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1380 (1353 - 1407)	1-17, 28-30 (p<0,001)
C18-Ch5 (22)	1349 (1309 - 1389)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1426 (1420 - 1432)	1-17, 28-30 (p<0,001)
C13-52-Ch6 (23)	1265 (1245 - 1284)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1333 (1330 – 1336)	1-17, 28-30 (p<0,001)
C17-63-Ch7 (24)	1443 (1426 - 1460)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1471 (1453 - 1489)	1-17, 28-30 (p<0,001)
Ch8 (25)	1464 (1463 - 1465)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1537 (1518 - 1555)	1-17, 28-30 (p<0,001)
C11-51-Ch9 (26)	1455 (1418 - 1492)	1-17, 28-30 (p<0,001)	1483 (1467 - 1499)	1-17, 28-30 (p<0,001)
62-Ch10 (27)	1412 (1356 - 1467)	1-27 (p<0,001)	1436 (1416 - 1456)	1-17, 28-30 (p<0,001)
66-Ch11 (28)	2271 (2258 – 2285)	1-27 (p<0,001)	2329 (2325 - 2332)	1-27 (p<0,001)
Ch12 (29)	2185 (2174 - 2197)	1-27 (p<0,001)	2226 (2220 - 2231)	1-27 (p<0,001)
Ch13 (30)	2090 (2085 - 2096)	1-27 (p<0,001)	2193 (2165 - 2220)	1-27 (p<0,001)
DMSO	1910 (1895 – 1925)	1-17 (p<0,001)	1910 (1895 – 1925)	1-17 (p<0,001)
TBH	2079 (2072 – 2086)	1-17 (p<0,001)	2079 (2072 – 2086)	1-17 (p<0,001)

*ns-nesignifikantno

Podaci su prikazani kao medijane (25.-75. percentil).

*p vrijednosti iz Mann-Whitney U testa poslije Kruskal-Wallisovog testa (p<0,001).

*p vrijednost - p1 odnosi se na razlike TAS vrijednosti između susptanci, bez dodatog oksidansa, dok se p2 odnosi na razlike TAS vrijednosti između jedinjenja nakon dodatog oksidansa.

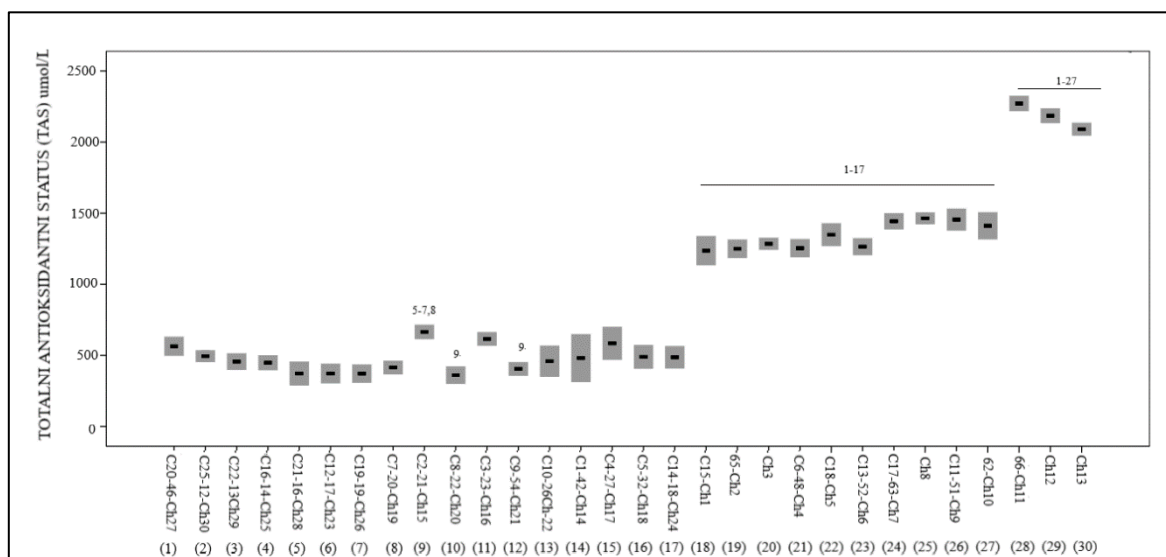
Iz tabele 26 se uočava da je najviša vrijednost TAS-a zabilježena u halkonu 66-Ch11, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima Ch12 i Ch13. Najniža vrijednost TAS-a je zabilježena u

halkonu C8-22-Ch20, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima: C21-16-Ch28, C12-17-Ch23 i C19-19-Ch26, redom. Zatim su upoređene TAS vrijednosti u uzorcima jedinjenja sa TAS vrijednostima dobijenim u kontrolnim uzorcima (DMSO; TBH). Vrijednosti TAS u uzorku sa DMSO i TBH su značajno više u poređenju sa jedinjenjima C20-46-Ch27 - C14-18-Ch24.

Poređenjem TAS vrijednosti između jedinjenja u uzorcima sa oksidansom (TBH), uočava se značajno niže TAS vrijednosti u halkonima C20-46-Ch27 - C14-18-Ch24, u odnosu na ispitivane halkone C15-Ch1 - Ch13.

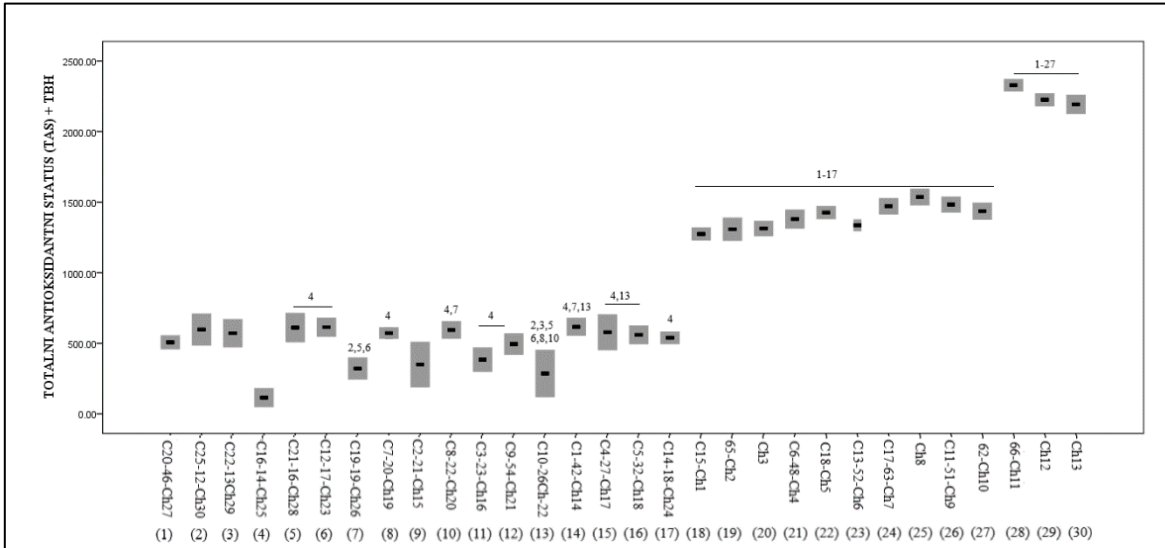
Nakon dodavanja TBH došlo je do smanjenja TAS-a u uzorcima: C20-46-Ch27, C16-14-Ch25, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C10-26-Ch-22 i C4-27-Ch17, dok je do povećanja TAS-a došlo u uzorcima: C25-12-Ch30, C22-13Ch29, C21-16-Ch28, C12-17-Ch23, C7-20-Ch19, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21, C1-42-Ch14, C5-32-Ch18 - Ch13. Poređenjem TAS vrijednosti između jedinjenja sa oksidansom (TBH), može se uočiti da supstance C15-Ch1 - Ch13 imaju više TAS vrijednosti u odnosu na druga jedinjenja. Zatim su upoređena ispitivana jedinjenja sa kontrolnim uzorcima (DMSO; TBH). Vrijednosti TAS u uzorku sa DMSO i TBH su značajno više u poređenju sa jedinjenjima C20-46-Ch27 - C14-18-Ch24.

Grafički prikaz je dat na slikama 40 i 41. Na slici 40 na box plotovima su prikazane medijane - , a čone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednostima TAS-a između ispitivanih halkona su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 40. Grafički prikaz vrijednosti totalnog antioksidativnog statusa (TAS) ispitivanih halkona

Na slici 41 na box plotovima su prikazane medijane - , a čone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednostima TAS-a između ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH) su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 41. Grafički prikaz vrijednosti totalnog antioksidativnog statusa (TAS) ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH)

Vrijednosti sulfhidrilnih grupa (SHG), u uzorcima sa i bez dodatka oksidansa (TBH) prikazane su u tabeli 27.

Tabela 27. Vrijednost sulfhidrilnih grupa (SHG) u uzorcima različitih koncentracija antioksidansa

Oznaka halkona	SHG	p1	SHG-TBH	p2
C20-46-Ch27 (1)	0,278 (0,240 - 0,315)	14, 15 (p<0,001)	0,244 (0,186 - 0,301)	13-16 (p<0,001)
C25-12-Ch30 (2)	0,310 (0,281 - 0,340)	14, 15 (p<0,001)	0,231 (0,211 - 0,250)	13-16 (p<0,001)
C22-13-Ch29 (3)	0,306 (0,292 - 0,320)	14, 15 (p<0,001)	0,201 (0,199 - 0,202)	13-16 (p<0,001)
C16-14-Ch25 (4)	0,323 (0,315 - 0,330)	14, 15 (p<0,001)	0,176 (0,141 - 0,211)	13-16 (p<0,001)
C21-16-Ch28 (5)	0,328 (0,312 - 0,343)	14 (p=0,011), 15 (p<0,001)	0,285 (0,208 - 0,362)	13-16 (p<0,001)
C12-17-Ch23 (6)	0,301 (0,295 - 0,307)	14, 15 (p<0,001)	0,207 (0,183 - 0,231)	13-16 (p<0,001)
C19-19-Ch26 (7)	0,315 (0,314 - 0,317)	14, 15 (p<0,001)	0,230 (0,223 - 0,236)	13-16 (p<0,001)
C7-20-Ch19 (8)	0,308 (0,302 - 0,314)	14, 15 (p<0,001)	0,273 (0,241 - 0,305)	13-16 (p<0,001)
C2-21-Ch15 (9)	0,324 (0,314 - 0,334)	14 (p=0,011), 15 (p<0,001)	0,266 (0,198 - 0,334)	13-16 (p<0,001)
C8-22-Ch20 (10)	0,322 (0,317 - 0,327)	14, 15 (p<0,001)	0,270 (0,198 - 0,341)	13-16 (p=0,015)
C3-23-Ch16 (11)	0,273 (0,221 - 0,326)	14, 15 (p<0,001)	0,248 (0,239 - 0,257)	13-16 (p<0,001)

C9-54-Ch21 (12)	0,293 (0,281 – 0,305)	14, 15 (p<0,001)	0,293 (0,243 - 0,343)	13-16 (p=0,027)
C10-26-Ch-22 (13)	0,705 (0,627 – 0,784)	22, 30 (p=0,048)	0,814 (0,655 - 0,972)	1-12, 17-30 (p<0,001)
C1-42-Ch14 (14)	0,892 (0,863 – 0,920)	1-4 (p<0,001), 5 (p=0,011), 6-8, 9 (p=0,010), 10-12, 16 (p=0,013), 17 (p=0,031), 18 (p=0,019), 19, 20 (p=0,023), 22-24, 26, 27 (p=0,02), 28-30 (p<0,001)	0,892 (0,817 - 0,966)	1-12,17-30 (p<0,001)
C4-27-Ch17 (15)	0,935 (0,929 – 0,942)	1-12, 16 (p<0,001), 17 (p=0,013), 18-24, 26-30 (p<0,001)	0,772 (0,740 - 0,804)	1-12,17-30 (p<0,001)
C5-32-Ch18 (16)	0,338 (0,241- 0,435)	14 (p=0,013), 15 (p<0,001)	0,724 (0,707 - 0,740)	1-12, 17-20, 22-28, 30 (p<0,001)
C14-18-Ch24 (17)	0,380 (0,307 - 0,452)	14 (p=0,031), 15 (p=0,013)	0,240 (0,232 - 0,247)	13-16 (p<0,001)
C15-Ch1 (18)	0,355 (0,320 - 0,389)	14 (p=0,019), 15 (p<0,001)	0,277 (0,149 - 0,405)	13-16 (p<0,001)
65-Ch2 (19)	0,241 (0,119 – 0,363)	14, 15 (p<0,001)	0,041 (0,030 - 0,062)	13-16 (p<0,001)
Ch3 (20)	0,365 (0,360 – 0,371)	14 (p=0,023), 15 (p<0,001)	0,304 (0,199 - 0,409)	13-16 (p<0,001)
C6-48-Ch4 (21)	0,272 (0,167 – 0,377)	14, 15 (p<0,001)	0,362 (0,348 - 0,376)	13-15 (p<0,001)
C18-Ch5 (22)	0,015 (0,010 – 0,090)	13, 14, 15 (p<0,001)	0,192 (0,184 - 0,200)	13-16 (p<0,001)
C13-52-Ch6 (23)	0,277 (0,149 – 0,405)	14, 15 (p<0,001)	0,302 (0,290 - 0,315)	13-16 (p<0,001)
C17-63-Ch7 (24)	0,264 (0,077 – 0,451)	14, 15 (p<0,001)	0,011 (0,008 - 0,049)	13-16 (p<0,001)
Ch8 (25)	0,452 (0,216 – 0,687)	ns	0,245 (0,223 - 0,267)	13-16 (p<0,001)
C11-51-Ch9 (26)	0,041 (0,020 – 0,062)	13, 14, 15 (p<0,001)	0,174 (0,139 - 0,209)	13-16 (p<0,001)
62-Ch10 (27)	0,362 (0,348 – 0,376)	14 (p=0,022), 15 (p<0,001)	0,075 (0,041 - 0,290)	13-16 (p<0,001)
66-Ch11 (28)	0,302 (0,290 – 0,315)	14, 15 (p<0,001)	0,120 (0,032 - 0,209)	13-16 (p<0,001)
Ch12 (29)	0,245 (0,223 – 0,267)	14, 15 (p<0,001)	0,381 (0,355 - 0,407)	13, 14 (p<0,001)
Ch13 (30)	0,216 (0,141 – 0,290)	13 (p=0,048), 14, 15 (p<0,001)	0,246 (0,229 - 0,262)	13-16 (p<0,001)
DMSO	0,490 (0,650 – 0,810)	ns	0,490 (0,650 – 0,810)	ns
TBH	0,303 (0,383 – 0,463)	14, 15 (p<0,001)	0,303 (0,383 – 0,463)	13-16 (p<0,001)

*ns-nesignifikantno

Podaci su prikazani kao medijane (25.-75. percentil).

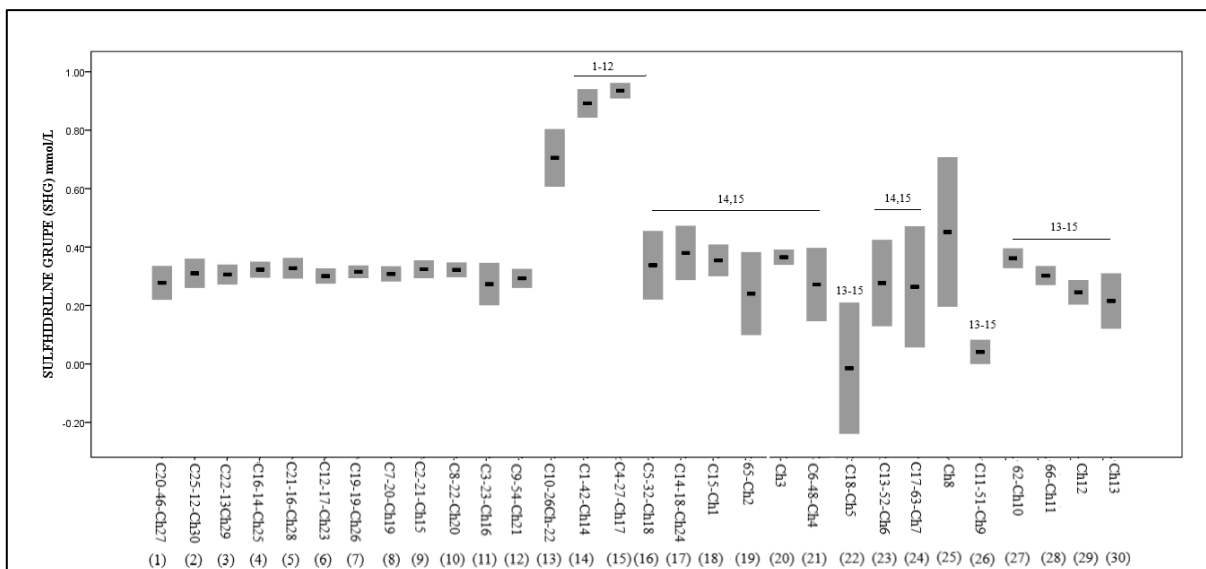
*p vrijednosti iz Mann-Whitney U testa poslije Kruskal-Wallisovog testa (p<0,001).

*p vrijednost - p1 odnosi se na razlike SHG vrijednosti između susptanci, bez dodatog oksidansa, dok se p2 odnosi na razlike SHG vrijednosti između jedinjenja nakon dodatog oksidansa.

Iz tabele 27 se uočava da je najviša vrijednost SHG zabilježena u halkonu C4-27-Ch17, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima C1-42-Ch14 i C10-26-Ch-22. Najniža vrijednost SHG je zabilježena u halkonu C18-Ch5, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima: C11-51-Ch9, Ch13, Ch12, 65-Ch2, C17-63-Ch7 redom. Zatim su upoređene SHG vrijednosti u uzorcima jedinjenja sa SHG vrijednostima dobijenim u kontrolnim uzorcima (DMSO; TBH). Uočene su statistički značajno više vrijednosti SHG u jedinjenjima C1-42-Ch14 i C4-27-Ch17 u poređenju sa TBH, nije utvrđena statistički značajna razlika u SHG u ispitivanim jedinjenjima u poređenju sa DMSO.

Poređenjem SHG vrijednosti između jedinjenja u uzorcima sa oksidansom (TBH), uočavaju se značajno niže SHG vrijednosti u halkonima: C20-46-Ch27 - C9-54-Ch21 i C14-18-Ch24 - Ch13, u odnosu na ispitivane halkone: C10-26-Ch-22 - C5-32-Ch18. Nakon dodavanja TBH došlo je do smanjenja SGH u uzorcima: C20-46-Ch27 - C3-23-Ch16, C4-27-Ch17, C14-18-Ch24 - Ch3, C17-63-Ch7, 62-Ch10, 66-Ch11, dok je do povećanja SHG došlo u uzorcima: C10-26-Ch-22, C5-32-Ch18, C6-48-Ch4 - C13-52-Ch6, Ch8, C11-51-Ch9, Ch12, Ch13. U uzorcima C9-54-Ch21 i C1-42-Ch14 nakon dodavanja antioksidansa nije došlo do promjene u vrijednostima SHG. U poređenju sa DMSO nijesu uočene statistički značajno različite vrijednosti SHG u ispitivanim halkonima, dok su u uzorcima: C10-26-Ch-22 - C5-32-Ch18 utvrđene statistički značajno veće vrijednosti u SHG u poređenju sa TBH.

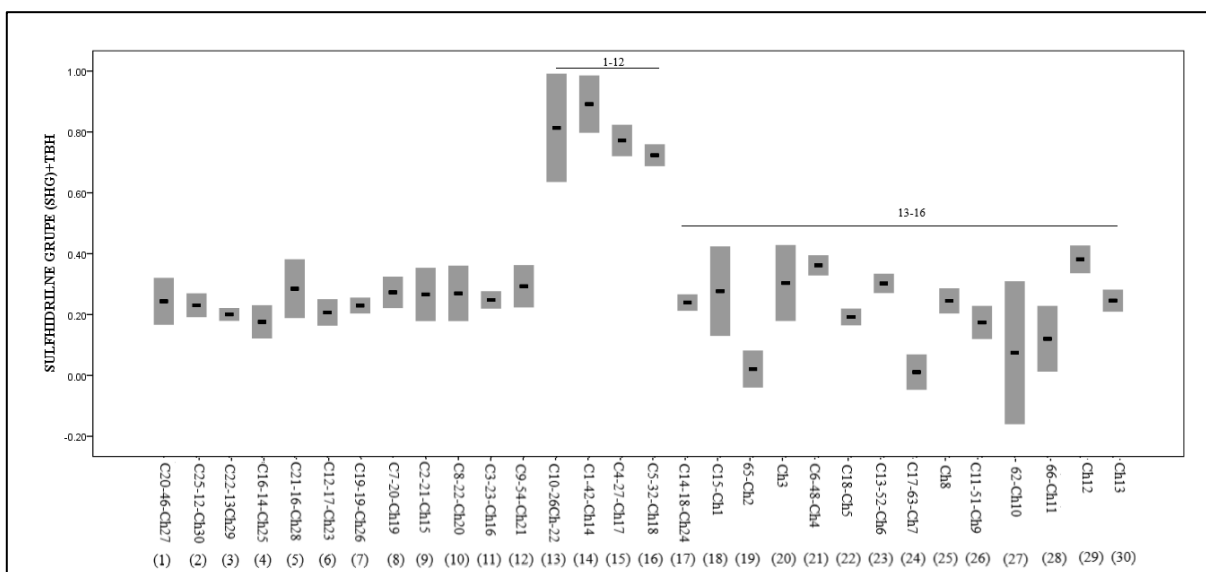
Grafički prikaz je dat na slikama 42 i 43. Na slici 42 na box plotovima su prikazane medijane - , a černe stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednostima SHG između ispitivanih halkona su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 42. Grafički prikaz vrijednosti sulfhidrilnih grupa (SHG) ispitivanih halkona

Na slici 43 na box plotovima su prikazane medijane - , a černe stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike

u vrijednostima SHG između ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH) su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 43. Grafički prikaz vrijednosti sulfhidrilnih grupa (SHG) ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH)

U tabeli 28 prikazane su koncentracije parametra totalnog oksidativnog statusa (TOS) u uzorcima sa i bez dodatka oksidansa (TBH).

Tabela 28. Totalni oksidativni status (TOS, u $\mu\text{mol/l}$) u uzorcima sa različitim koncentracijama antioksidansa

Oznaka halkona	TOS	p1	TOS-TBH	p2
C20-46-Ch27 (1)	22,3 (20,3 - 24,3)	ns	23,5 (22,7 - 24,3)	18-30 (p<0,001)
C25-12-Ch30 (2)	18,0 (16,8 - 19,1)	ns	28,4 (27,0 - 29,7)	18-30 (p<0,001)
C22-13-Ch29 (3)	22,0 (17,9 - 26,1)	ns	26,4 (24,9 - 27,8)	18-30 (p<0,001)
C16-14-Ch25 (4)	25,2 (24,2 - 26,2)	ns	28,9 (25,7 - 32,1)	18-30 (p<0,001), 22 (p=0,014)
C21-16-Ch28 (5)	19,1 (18,2 - 20,0)	ns	25,6 (25,3 - 25,9)	18-30 (p<0,001)
C12-17-Ch23 (6)	26,3 (19,3 - 33,2)	ns	24,7 (21,0 - 28,3)	18-30 (p<0,001)
C19-19-Ch26 (7)	21,1 (19,3 - 22,9)	ns	23,3 (21,0 - 25,6)	18-30 (p<0,001)
C7-20-Ch19 (8)	30,0 (29,2 - 30,8)	ns	25,1 (23,5 - 26,7)	18-30 (p<0,001)

C2-21-Ch15 (9)	18,8 (18,3 - 19,3)	ns	31,6 (31,2 - 31,9)	18-21, 23 (p<0,001), 24 (p=0,011), 25, 26, 28, 29 (p=0,015), 30 (p<0,001)
C8-22-Ch20 (10)	19,5 (19,1 - 19,9)	ns	25,9 (21,5 - 30,3)	18-30 (p<0,001)
C3-23-Ch16 (11)	31,5 (27,8 - 35,1)	ns	23,4 (22,3 - 24,5)	18-30 (p<0,001)
C9-54-Ch21 (12)	24,0 (19,9 - 28,1)	ns	23,0 (20,7 - 25,2)	18-30 (p<0,001)
C10-26-Ch22 (13)	20,3 (19,5 - 21,2)	ns	19,8 (19,5 - 20,0)	18-30 (p<0,001)
C1-42-Ch14 (14)	20,1 (18,6 - 22,2)	ns	20,7 (15,8 - 25,5)	18-30 (p<0,001)
C4-27-Ch17 (15)	41,8 (20,9 - 62,7)	ns	20,8 (19,6 - 21,9)	17 (p=0,011), 18-30 (p<0,001)
C5-32-Ch18 (16)	25,2 (19,6 - 30,8)	ns	20,3 (17,2 - 23,4)	17-30 (p<0,001)
C14-18-Ch24 (17)	34,4 (32,2 - 36,6)	ns	36,6 (32,4 - 40,8)	13 (p=0,005), 14 (p=0,010), 15 (p=0,011), 16, 18, 19, 20, 21 (p=0,013), 25, 30 (p=0,033)
C15-Ch1 (18)	33,1 (32,9 - 33,2)	ns	53,8 (52,3 - 55,3)	1-17 (p<0,001)
65-Ch2 (19)	34,4 (32,8 - 36,0)	ns	54,6 (51,6 - 57,5)	1-17 (p<0,001)
Ch3 (20)	32,0 (31,2 - 32,7)	ns	54,5 (52,8 - 56,1)	1-17 (p<0,001)
C6-48-Ch4 (21)	34,6 (34,4 - 34,7)	ns	52,3 (48,1 - 56,4)	1-17 (p=0,013)
C18-Ch5 (22)	36,0 (35,7 - 36,2)	ns	44,4 (41,1 - 47,7)	1-3, 4 (p=0,014), 5-8, 10-16 (p<0,001)
C13-52-Ch6 (23)	35,3 (34,6 - 36,0)	ns	48,5 (46,0 - 52,0)	1-16 (p<0,001)
C17-63-Ch7 (24)	36,5 (35,7 - 37,3)	ns	47,4 (47,0 - 47,7)	1-8, 9 (p=0,011), 10-16 (p<0,001)
Ch8 (25)	34,8 (34,3 - 35,3)	ns	56,2 (54,6 - 57,8)	1-17 (p<0,001)
C11-51-Ch9 (26)	35,3 (34,4 - 36,1)	ns	47,7 (47,3 - 48,0)	1-16 (p<0,001)
62-Ch10 (27)	27,8 (27,0 - 28,5)	ns	45,1 (44,7 - 45,5)	1-8, 10-16 (p<0,001)
66-Ch11 (28)	28,9 (28,1 - 29,7)	ns	48,8 (47,9 - 49,6)	1-16 (p<0,001)
Ch12 (29)	31,0 (29,4 - 32,5)	ns	47,0 (44,4 - 49,6)	1-8, 9 (p=0,011), 10-16 (p<0,001)
Ch13 (30)	31,4 (30,5 - 32,3)	ns	51,0 (50,6 - 51,3)	1-17 (p=0,033)
DMSO	36,0 (35,2 - 36,8)	ns	36,0 (35,2 - 36,8)	13-16, 18-30 (p<0,001)
TBH	57,6 (55,4 - 59,8)	1-30 (p<0,001)	57,6 (55,4 - 59,8)	1-17 (p<0,001)

*ns-nesignifikantno

Podaci su prikazani kao medijane (25.-75. percentil).

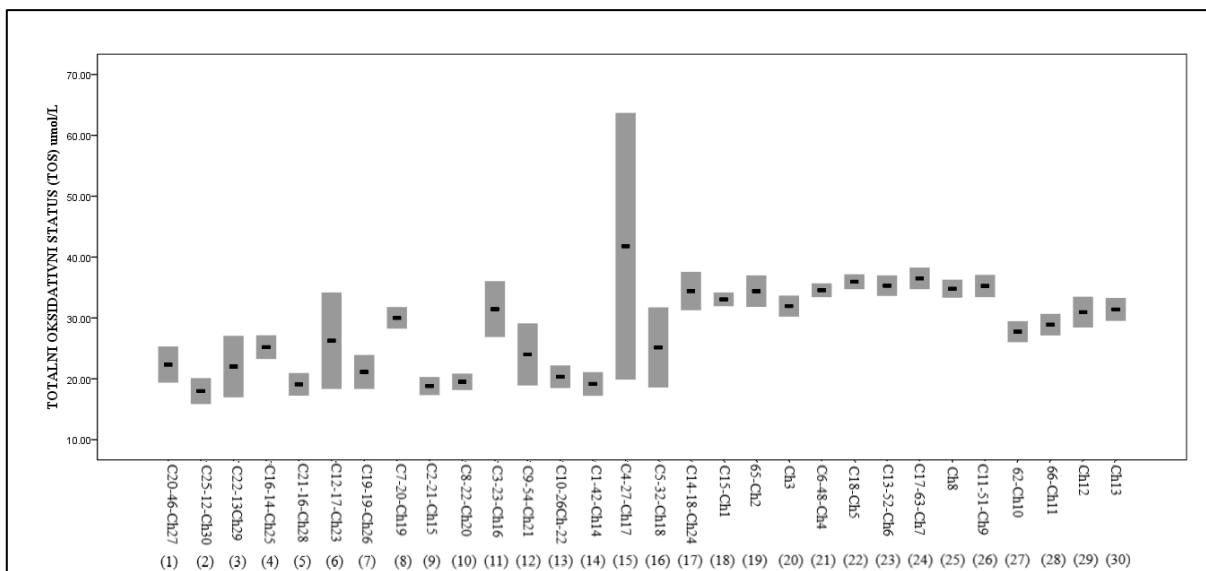
*p vrijednosti iz Mann-Whitney U testa poslije Kruskal-Wallisovog testa (p<0,001).

*p vrijednost- p1 odnosi se na razlike TOS vrijednosti između susptanci, bez dodatog oksidansa, dok se p2 odnosi na razlike TOS vrijednosti između jedinjenja nakon dodatog oksidansa.

Iz tabele 28 se uočava da je najviša vrijednost TOS zabilježena u halkonu C4-27-Ch17, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima: C17-63-Ch7, C18-Ch5, C13-52-Ch6 i C11-51-Ch9, redom. Najniža vrijednost TOS je zabilježena u halkonu C25-12-Ch30, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima: C2-21-Ch15, C21-16-Ch28 i C8-22-Ch20 redom. Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u TOS vrijednostima u ispitivanim halkonima. TOS vrijednosti u uzorcima koji su sadržali ispitivana jedinjenja upoređivani su sa TOS vrijednostima dobijenim u kontrolnim uzorcima (DMSO; TBH). Jedinjenja C20-46-Ch27 i Ch13 pokazuju statistički značajno niže vrijednosti u poređenju sa TBH. Nije zabilježena statistički značajna razlika u ispitivanim halkonima u poređenju sa DMSO.

Nakon dodavanja TBH došlo je do smanjenja TOS u uzorcima: C12-17-Ch23, C7-20-Ch19, C3-23-Ch16 - C10-26-Ch-22, C4-27-Ch17 i C5-32-Ch18, dok je do povećanja TOS-a došlo u uzorcima: C20-46-Ch27 - C21-16-Ch28, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15, C8-22-Ch20, C1-42-Ch14, C14-18-Ch24 - Ch13. Poređenjem TOS vrijednosti između jedinjenja u uzorcima sa oksidansom (TBH), uočavaju se značajno niže TOS vrijednosti u halkonima: C20-46-Ch27 - C14-18-Ch24, u odnosu na ispitivane halkone: C15-Ch1 - Ch13. Jedinjenja: C20-46-Ch27 - C14-18-Ch24 pokazuju statistički značajno niže vrijednosti u poređenju sa TBH, dok jedinjenja: C10-26-Ch-22 - C5-32-Ch18 i C15-Ch1 - Ch13 pokazuju statistički značajno niže vrijednosti u poređenju sa DMSO.

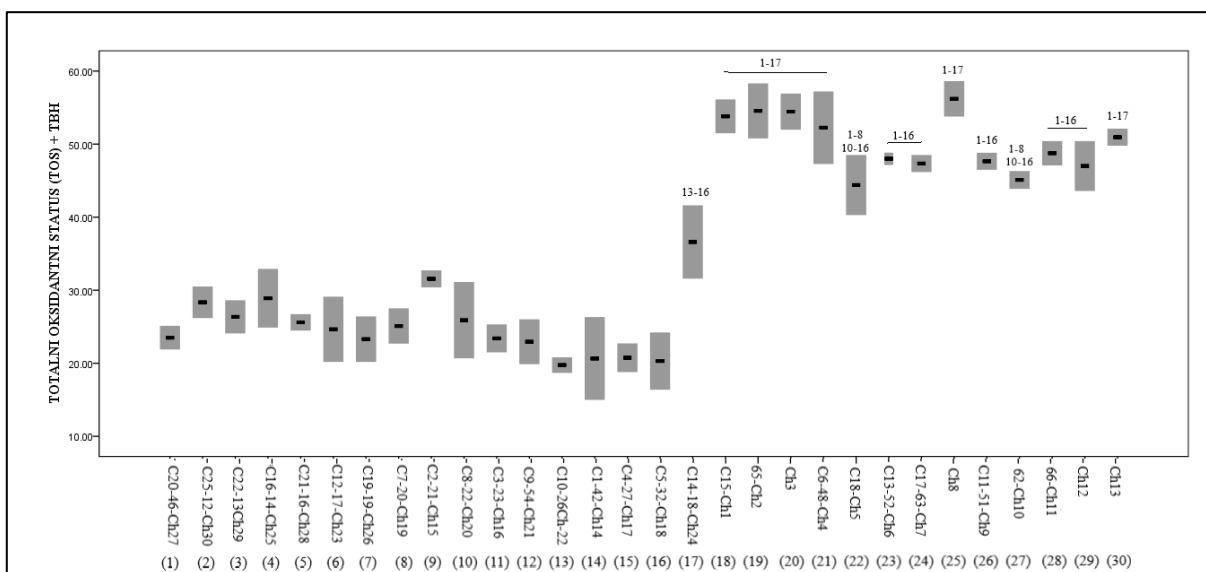
Grafički prikaz je dat na slikama 44 i 45. Na slici 44 na box plotovima su prikazane medijane - , a čone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednostima TOS-a između ispitivanih halkona su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 44. Grafički prikaz vrijednosti totalnog oksidativnog statusa (TOS) ispitivanih halkona

Na slici 45 na box plotovima su prikazane medijane - , a čone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike

u vrijednostima TOS-a između ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH) su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 45. Grafički prikaz vrijednosti totalnog oksidativnog statusa (TOS) ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH)

U tabeli 29 prikazane su vrijednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB), u uzorcima sa i bez dodatka oksidansa (TBH).

Tabela 29. Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB, u HKU) u uzorcima sa različitom koncentracijom antioksidansa

Oznaka halkona	PAB	p1	PAB-TBH	p2
C20-46-Ch27 (1)	62 (60 - 65)	2-4, 6, 9-15, 18-22 (p<0,001), 24 (p=0,018), 26, 28, 30 (p<0,001)	192 (189 - 194)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C25-12-Ch30 (2)	171 (171 - 172)	1, 5, 7, 8, 13-30 (p<0,001)	104 (100 - 108)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 17 (p=0,015), 28 (p=0,018), 29, 30 (p=0,032)
C22-13-Ch29 (3)	172 (171 - 173)	1, 5, 7, 8, 13-30 (p<0,001)	101 (100-103)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 17 (p=0,015), 28(p=0,018), 29, 30 (p=0,032)
C16-14-Ch25 (4)	173 (171 - 176)	1, 5, 7, 8, 13-30 (p<0,001)	189 (188 - 190)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)

C21-16-Ch28 (5)	66 (65 - 67)	2-4, 6, 9-15, 18-21 (p<0,001), 22 (p=0,024), 26, 28, 30 (p<0,001)	101 (97 – 105)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 15 (p=0,039), 17 (p=0,015), 29 (p<0,001)
C12-17-Ch23 (6)	173 (172 – 175)	1, 5-8, 13-30 (p<0,001)	188 (186 – 189)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C19-19-Ch26 (7)	65 (65 - 65)	2-4, 6, 9-15, 18-21 (p<0,001), 22 (p=0,016), 26, 28, 30 (p<0,001)	188 (187 – 189)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C7-20-Ch19 (8)	64 (64 - 65)	2-4, 6, 9-15, 18-21, 22 (p=0,013), 24 (p=0,044), 26, 28, 30 (p<0,001)	101 (100 – 101)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 15 (p=0,032), 29 (p<0,001)
C2-21-Ch15 (9)	178 (176 – 181)	1, 5, 7, 8, 13-30 (p<0,001)	192 (191 – 193)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C8-22-Ch20 (10)	175 (174 - 176)	1, 5, 7, 8, 13-30 (p<0,001)	99 (98 – 100)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 15 (p=0,019), 29 (p<0,001)
C3-23-Ch16 (11)	177 (177 - 178)	1, 5, 7, 8, 13-30 (p<0,001)	188 (187 – 188)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C9-54-Ch21 (12)	175 (173 - 178)	1, 5, 13-30 (p<0,001)	96 (92 – 100)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 29 (p<0,001)
C10-26-Ch-22 (13)	113 (111 – 116)	1-12, 16, 17 (p<0,001), 20 (p=0,012), 22 (p=0,024), 23-25, 27, 29 (p<0,001)	137 (135 – 138)	1-12, 17-30 (p<0,001)
C1-42-Ch14 (14)	102 (91 – 113)	1-12, 17, 20, 21 (p<0,001)	119 (118 – 120)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 17, 18 (p<0,001), 19 (p=0,046), 20, 21, 22 (p=0,032), 25, 26 (p=0,046), 27 (p=0,039), 28-30 (p<0,001)
C4-27-Ch17 (15)	97 (95 - 99)	1-12, 17 (p<0,001), 19 (p=0,025), 20, 21 (p<0,001)	129 (126 – 131)	1, 4 (p<0,001), 5 (p=0,039), 6, 7, 8 (p=0,032), 9, 10 (p=0,018), 11, 12, 17-30 (p<0,001)
C5-32-Ch18 (16)	80 (68 - 92)	2-4, 6, 9-13, 19-21 (p<0,001)	117 (116 – 117)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 17, 18, 20, 21, 25, 28-30 (p<0,001)
C14-18-Ch24 (17)	59 (56 - 62)	2-4, 6, 9-15, 18-22 (p<0,001), 23 (p=0,019), 24, 25 (p=0,018), 26, 27 (p=0,019), 28, 29 (p=0,017), 30 (p<0,001)	74 (73 – 75)	1 (p<0,001), 2 (p=0,015), 3 (p=0,022), 4, 5 (p=0,046), 6, 7, 9, 11, 13-16 (p<0,001)

C15-Ch1 (18)	103 (100 – 107)	1-12 (p<0,001), 16 (p=0,024), 17, 20-21 (p<0,001)	83 (81 – 85)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13-16, 29 (p<0,001)
65-Ch2 (19)	120 (119 – 121)	1-12, 15 (p=0,025), 16, 17, 22-30 (p<0,001)	92 (85 – 99)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13-15, 29 (p<0,001)
Ch3 (20)	138 (136 – 139)	1-12 (p<0,001), 13 (p=0,012), 14-18, 22-30 (p<0,001)	79 (78 – 80)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13-15 (p<0,001), 29 (p=0,018)
C6-48-Ch4 (21)	130 (128 – 132)	1-12, 14-18, 22-30 (p<0,001)	83 (82 – 84)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13-15 (p<0,001), 29 (p=0,018)
C18-Ch5 (22)	89 (85 - 93)	1-4 (p<0,001), 5 (p=0,024), 6, 7 (p=0,016), 8 (p=0,013), 9-12 (p<0,001), 13 (p=0,024), 17, 19-21 (p<0,001)	91 (89 – 93)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 14 (p=0,032), 15, 29 (p<0,001)
C13-52-Ch6 (23)	83 (81 - 85)	2-4, 6, 9-13 (p<0,001), 17 (p=0,019), 19-21 (p<0,001)	94 (92 – 96)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 29 (p<0,001)
C17-63-Ch7 (24)	86 (86 - 87)	1 (p=0,018), 2-4, 6 (p<0,001), 8 (p=0,044), 9-12, 13, 17, 19-21 (p<0,001)	94 (92 – 95)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 29 (p<0,001)
Ch8 (25)	83 (80 - 86)	2-4, 6, 9-13 (p<0,001), 17 (p=0,018), 19-21 (p<0,001)	84 (82 – 85)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13-16, 29 (p<0,001)
C11-51-Ch9 (26)	92 (85 - 99)	1-12, 17, 19-21 (p<0,001)	92 (90 – 94)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 14 (p=0,032), 15, 29 (p<0,001)
62-Ch10 (27)	83 (82 - 84)	2-4, 6, 9-13 (p<0,001), 17 (p=0,019), 19-21 (p<0,001)	92 (91 – 92)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 14 (p=0,032), 15, 29 (p<0,001)
66-Ch11 (28)	94 (92 - 96)	1-12, 17, 19-21 (p<0,001)	75 (64 – 85)	1 (p<0,001), 2 (p=0,018), 3 (p=0,027), 4, 6, 7, 9, 11, 13-16 (p<0,001)
Ch12 (29)	83 (82 - 85)	2-4, 6, 9-13 (p<0,001), 17 (p=0,017), 19-21 (p<0,001)	50 (31 – 68)	1-16, 18, 19 (p<0,001), 20 (p=0,018), 21-27 (p<0,001)

Ch13 (30)	92 (91 - 92)	1-12, 17, 19-21 (p<0,001)	76 (70 - 82)	1 (p<0,001), 2 (p=0,032), 3 (p=0,046), 4, 6, 7, 9, 11, 13-16 (p<0,001)
DMSO	85 (84 - 86)	2-4, 6, 9-13 (p<0,001), 17 (p=0,019), 19-21 (p<0,001)	85 (84 - 86)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13-16, 29 (p<0,001)
TBH	107 (103 - 111)	1-12 (p<0,001), 16 (p=0,024), 17, 20, 21 (p<0,001)	107 (103 - 111)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 13 (p<0,001), 17 (p=0,015), 28 (p=0,018), 29, 30 (p=0,032)

*ns-nesignifikantno

Podaci su prikazani kao medijane (25.-75. percentil).

*p vrijednosti iz Mann-Whitney U testa poslije Kruskal-Wallisovog testa (p<0,001).

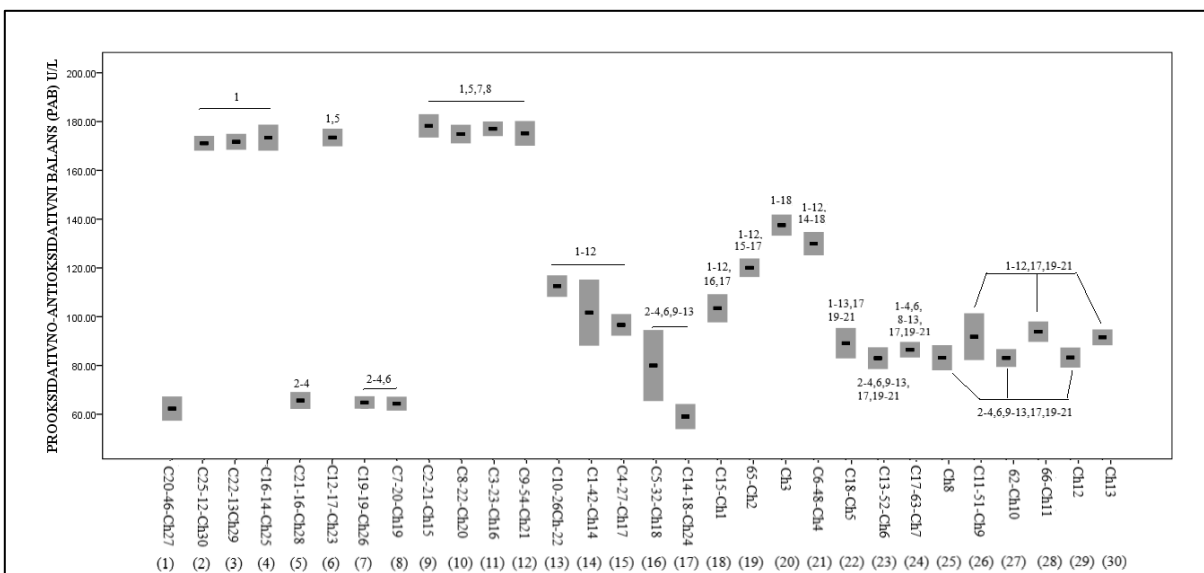
*p vrijednost - p1 odnosi se na razlike PAB vrijednosti između susptanci, bez dodatog oksidansa, dok se p2 odnosi na razlike PAB vrijednosti između jedinjenja nakon dodatog oksidansa.

Poređenjem PAB vrijednosti između jedinjenja u uzorcima bez oksidansa, uočavaju se značajno niže PAB vrijednosti u halkonima: C14-18-Ch24, C20-46-Ch27, C7-20-Ch19, C19-19-Ch26, C5-32-Ch18, C13-52-Ch6, Ch8, 62-Ch10 i Ch12, C17-63-Ch7, C18-Ch5, C11-51-Ch9, 66-Ch11, u odnosu na ispitivane halkone: C25-12-Ch30 - C12-17-Ch23, C2-21-Ch15 - C9-54-Ch21. Zatim su upoređene PAB vrijednosti u uzorcima jedinjenja sa PAB vrijednostima dobijenim u kontrolnim uzorcima (DMSO; TBH). Jedinjenja: C20-46-Ch27 - C9-54-Ch21, C5-32-Ch18, C14-18-Ch24, Ch3, C6-48-Ch4 se statistički značajno razlikuju u poređenju sa TBH, dok se jedinjenja: C25-12-Ch30 - C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C2-21-Ch15 - C10-26-Ch-22, C14-18-Ch24, 65-Ch2 - C6-48-Ch4 statistički značajno razlikuju u poređenju sa DMSO.

Poređenjem PAB vrijednosti između jedinjenja u uzorcima sa oksidansom (TBH), uočavaju se značajno niže PAB vrijednosti u halkonima: C14-18-Ch24 - Ch13, u odnosu na ispitivane halkone: C20-46-Ch27 - C14-18-Ch24.

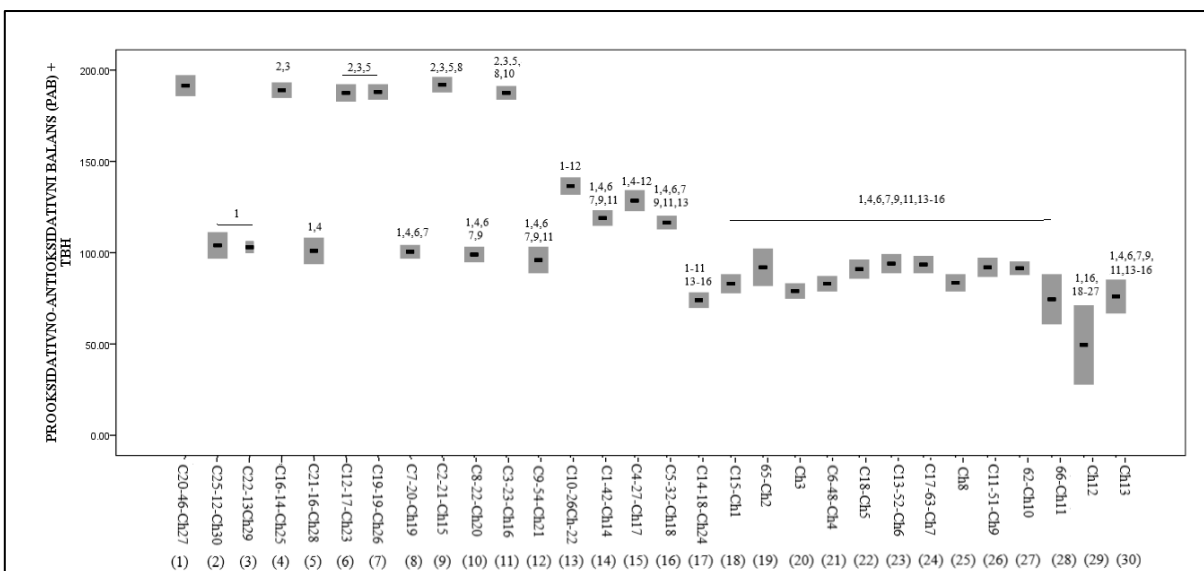
Nakon dodavanja TBH došlo je do smanjenja PAB u uzorcima: C25-12-Ch30, C22-13-Ch29, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21, C15-Ch1, Ch3, C6-48-Ch4, 66-Ch11, Ch12, Ch13, dok je do povećanja PAB došlo u uzorcima: C20-46-Ch27, C16-14-Ch25 - C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C10-26-Ch-22 - C14-18-Ch24, 65-Ch2, C18-Ch5 - Ch8, 62-Ch10. U uzorku C11-51-Ch9 nakon dodavanja antioksidansa nije došlo do promjene u vrijednostima PAB. Jedinjenja: C20-46-Ch27, C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C10-26-Ch-22 - C5-32-Ch18, Ch12 se statistički značajno razlikuju u poređenju sa DMSO, dok se jedinjenja: C20-46-Ch27, C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C10-26-Ch-22, C14-18-Ch24, 66-Ch11 - Ch13 statistički značajno razlikuju u poređenju sa TBH.

Grafički prikaz je dat na slikama 46 i 47. Na slici 46 na box plotovima su prikazane medijane - , a čone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednostima PAB-a između ispitivanih halkona su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 46. Grafički prikaz vrijednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) u uzorcima ispitivanih halkona

Na slici 47 na box plotovima su prikazane medijane - , a čeonice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednostima PAB-a između ispitivanih halkona sa antioksidansom (TBH) su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 47. Grafički prikaz vrijednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) u uzorcima ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH)

Vrijednosti oksidativnih skorova za ispitivana jedinjenja prikazani su u tabeli 30.

Tabela 30. Vrijednosti oksidativnih skora u ispitivanim halkanima

Oznaka halkana	Oksidativni skor	p1	Oksidativni skor-TBH	p2
C20-46-Ch27 (1)	13 (12 - 13)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001)	199 (179 - 219)	2-4, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C25-12-Ch30 (2)	149 (142 - 155)	1, 5, 7, 8, 9, 13-30 (p<0,001)	32 (6 - 58)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001)
C22-13-Ch29 (3)	158 (153 - 163)	1, 5, 7, 8, 9, 13-30 (p<0,001)	42 (32 - 53)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 14-18 (p<0,001)
C16-14-Ch25 (4)	159 (150 - 168)	1, 5, 7, 8, 9 (p<0,001)	284 (278 - 289)	1-6, 8, 10 (p<0,001), 11 (p=0,032), 12-30 (p<0,001)
C21-16-Ch28 (5)	34 (30 - 38)	1, 2, 3, 4, 6, 9-17 (p<0,001), 18 (p=0,011)	10 (-4 - 23)	1, 4-7, 9, 11, 14 (p<0,001), 16 (p=0,028), 17 (p<0,001)
C12-17-Ch23 (6)	179 (173 - 184)	2, 7-9, 14-30 (p<0,001)	182 (168 - 196)	2-5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C19-19-Ch26 (7)	48 (40 - 56)	1, 2-4, 9, 11-17 (p<0,001), 10 (p=0,002), 18 (p=0,001), 30 (p=0,030)	230 (224 - 236)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C7-20-Ch19 (8)	39 (37 - 41)	2-4, 7, 10-17 (p<0,001), 18 (p=0,004)	19 (12 - 27)	1, 4, 6-9, 11, 14 (p<0,001), 15 (p=0,014), 16, 17 (p<0,001)
C2-21-Ch15 (9)	127 (126 - 127)	1, 5, 10, 14-19, 23-30 (p<0,001), 8 (p=0,002), 20 (p=0,001), 21 (p=0,007), 22 (p=0,005),	224 (221 - 227)	2, 3, 5, 8, 10, 12-30 (p<0,001)
C8-22-Ch20 (10)	177 (177 - 177)	1, 2, 6, 8, 9, 14-30 (p<0,001)	14 (-9 - 36)	1, 4, 6, 7, 9, 10, 14 (p<0,001), 15 (p=0,035), 16 (p=0,015), 17 (p<0,001)
C3-23-Ch16 (11)	147 (137 - 157)	1, 2, 6, 8, 9, 14-30 (p<0,001)	214 (207 - 221)	2, 3 (p<0,001), 4 (p=0,032), 5, 8, 10-30 (p<0,001)
C9-54-Ch21 (12)	177 (169 - 186)	1, 2, 6, 8, 9, 14-30 (p<0,001)	20 (8 - 32)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 14 (p<0,001), 15 (p=0,013), 16, 17 (p<0,001)

C10-26-Ch-22 (13)	-44 (-76 - -12)	1, 3-5, 7, 8, 10-12, 16, 20-22 (p<0,001), 6, 19 (p=0,002), 9, 15 (p=0,001), 23 (p=0,015), 24 (p=0,026), 25 (p=0,043), 27 (p=0,023)	4 (-9 - 16)	1, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 17 (p<0,001), 18 (p=0,037)
C1-42-Ch14 (14)	-129 (-163 - -95)	2-13, 18-30 (p<0,001), 1 (p=0,007)	-108 (-128 - -87)	1-13, 18-30 (p<0,001)
C4-27-Ch17 (15)	-152 (-171 - -133)	1-13, 18-30 (p<0,001), 14, 17 (p=0,003)	-55 (-83 - 27)	1-4, 6, 7 (p<0,001), 8 (p=0,014), 9, 10 (p=0,013), 11, 12 (p=0,013), 18, 23, 24 (p=0,012), 25 (p=0,044), 26 (p=0,015)
C5-32-Ch18 (16)	-75 (-79 - -72)	1-13, 19-27 (p<0,001), 17 (p=0,003), 28 (p=0,001), 29 (p=0,027), 30 (p=0,045)	-61 (-63 - 59)	1-4 (p<0,001), 5 (p=0,028), 6-9, 10 (p=0,015), 11, 12, 18-24 (p<0,001), 25 (p=0,020), 26 (p<0,001)
C14-18-Ch24 (17)	-35 (-47 - -22)	2-4, 9-13, 15, 16, 21, 22 (p<0,001), 1 (p=0,008), 6 (p=0,011), 8, 20 (p=0,001), 9 (p=0,004), 19 (p=0,012)	-108 (-111 - -104)	1-13, 17-30 (p<0,001)
C15-Ch1 (18)	34 (29 - 38)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001), 19 (p=0,012)	72 (64 - 77)	1, 4, 6, 7, 9, 11 (p<0,001), 13 (p=0,037), 14-17 (p<0,001), 27 (p=0,015), 28 (p=0,014), 29 (p=0,022), 30 (p<0,001)
65-Ch2 (19)	46 (46 - 47)	2-4, 6, 9, 11-17 (p<0,001), 10, 18 (p=0,001), 30 (p=0,039)	36 (10 - 69)	1-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001)
Ch3 (20)	55 (54 - 57)	2-4, 6, 11-18 (p<0,001), 10 (p=0,007), 29 (p=0,014), 30 (p=0,008)	54 (48 - 63)	1-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001), 30 (p=0,039)

C6-48-Ch4 (21)	53 (52 - 55)	2-4, 6, 9, 11-18 (p<0,001), 1 (p=0,046), 10 (p=0,005), 29 (p=0,020), 30 (p=0,012)	54 (30 - 70)	1-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001)
C18-Ch5 (22)	23 (22 - 23)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001)	24 (19 - 27)	2-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001)
C13-52-Ch6 (23)	20 (19 - 21)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001)	29 (25 - 40)	2-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001)
C17-63-Ch7 (24)	17 (14 - 19)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001)	23 (18 - 26)	2-4, 6, 7, 9, 11, 14- 17(p<0,001), 15 (p=0,011)
Ch8 (25)	12 (8 - 15)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001)	12 (-17 - 30)	2-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001), 16 (p=0,020)
C11-51-Ch9 (26)	20 (14 - 26)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001)	19 (17 - 22)	2-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001), 15 (p=0,015)
62-Ch10 (27)	10 (8 - 11)	2-4, 6, 9-13, 15, 16 (p<0,001), 14, 17 (p=0,001)	-2 (-6 - 7)	1-4, 6, 7, 9, 11, 14-17 (p<0,001)
66-Ch11 (28)	-12 (-12 - -12)	2-4, 6, 9-13, 15, 16 (p<0,001), 14 (p=0,026), 17 (p=0,027), 21 (p=0,014), 22 (p=0,020)	-3 (-4 - -1)	1-4, 6, 7, 9, 11, 14, 17 (p<0,001), 18 (p=0,015)
Ch12 (29)	-15 (-17 - -13)	2-4, 6, 9-13, 15, 16 (p<0,001), 8 (p=0,030), 14 (p=0,043), 17 (p=0,045), 20 (p=0,039), 21 (p=0,008), 22 (p=0,012)	1 (-2 - 1)	1-4, 6, 7, 9-17 (p<0,001), 18 (p=0,022)
Ch13 (30)	-5 (-6 - -4)	2-4, 6, 9-13, 15, 16 (p<0,001), 14 (p=0,007), 17 (p=0,008), 21 (p=0,046)	-12 (-36 - -5)	1-4, 6, 7, 9-17, 18 (p<0,001), 20 (p=0,039)
DMSO	36 (27 - 44)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001), 19 (p=0,012)	36 (27 - 44)	2-4, 6, 7, 9-17 (p<0,001)
TBH	56 (42 - 67)	2-4, 6, 9-17 (p<0,001), 29 (p=0,014), 30 (p=0,008)	56 (42 - 67)	1-4, 6, 7, 9-17 (p<0,001)

*ns-nesignifikantno

Podaci su prikazani kao medijane (25.-75. percentil).

*p vrijednosti iz Mann-Whitney U testa poslije Kruskal-Wallisovog testa (p<0,001).

*p vrijednost - p1 odnosi se na razlike oksid skora između jedinjenja, bez dodatog oksidansa, dok se p2 odnosi na razlike Oksid skora između jedinjenja nakon dodatog oksidansa.

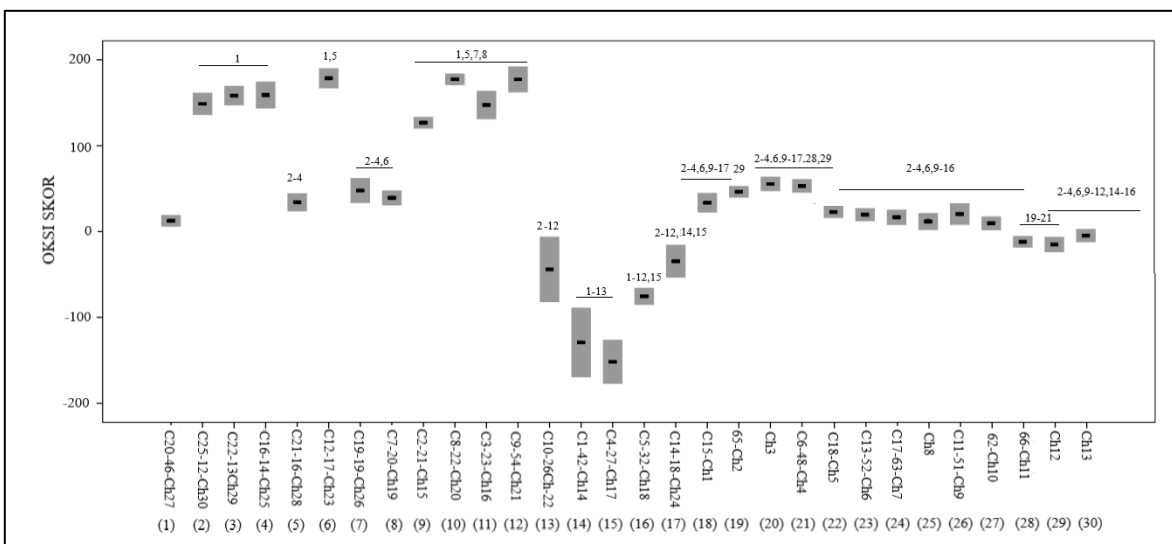
Oksi skor predstavlja razliku vrijednosti prooksidativnog i antioksidativnog skora, i direktno opisuje redoks potencijal određenog jedinjenja. Veća vrijednost oksidativnog skora ukazuje da su prooksidansi u uzorku nadvladali antioksidanse i da je ispitivano jedinjenje slab antioksidans i suprotno.

Iz tabele 30 se uočava da je najniža vrijednost oksidativnog skora uočena u halkonu C4-27-Ch17, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima: C1-42-Ch14, C5-32-Ch18, C10-26-Ch-22, C14-18-Ch24, Ch12, 66-Ch11 i Ch13, redom. Navedeni halkoni imaju najveći antioksidativni potencijal. Najveća vrijednost oksidativnog skora, odnosno najveća prooksidativna aktivnost je zabilježena u halkonu C12-17-Ch23, nakon čega slijede vrijednosti u halkonima: C8-22-Ch20 i C9-54-Ch21, C16-14-Ch25, C22-13-Ch29, C25-12-Ch30, C3-23-Ch16, C2-21-Ch15, Ch3, C6-48-Ch4, C19-19-Ch26, 65-Ch2, C7-20-Ch19, C21-16-Ch28 i C15-Ch1, C18-Ch5, C13-52-Ch6 i C11-51-Ch9, C17-63-Ch7, C20-46-Ch27, Ch8, 62-Ch10, redom.

Zatim su upoređene vrijednosti oksidativnog skora u uzorcima jedinjenja sa vrijednostima oksidativnog skora dobijenim u kontrolnim uzorcima (DMSO; TBH). Jedinjenja: C25-12-Ch30 - C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C2-21-Ch15 - C14-18-Ch24, Ch12, Ch13 se statistički značajno razlikuju u poređenju sa TBH, dok se jedinjenja: C25-12-Ch30 - C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C2-21-Ch15 - C14-18-Ch24, 65-Ch2 statistički značajno razlikuju u poređenju sa DMSO.

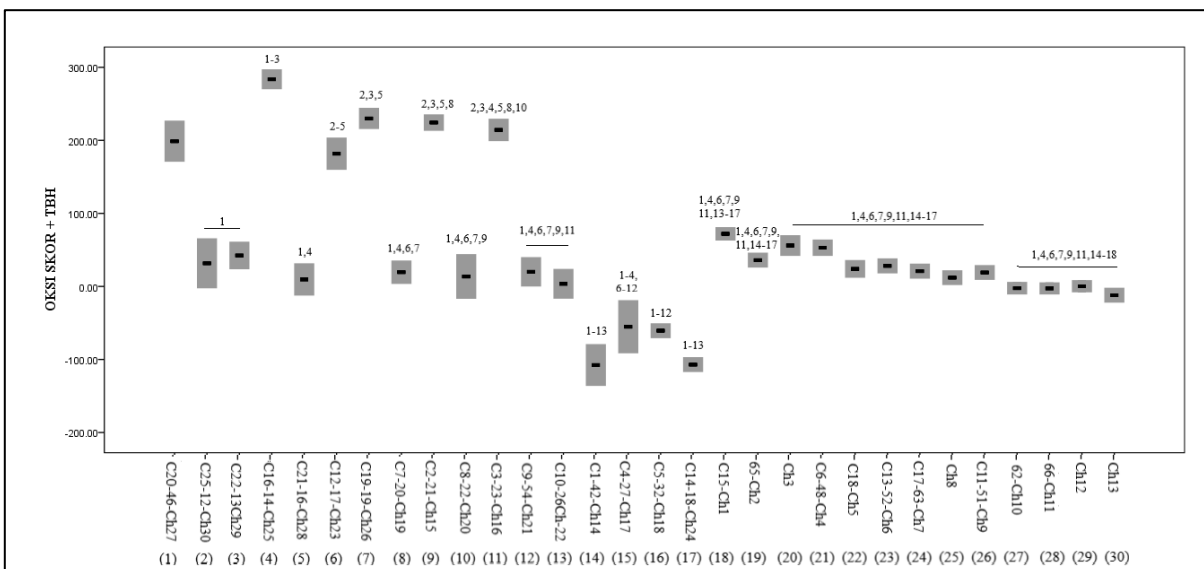
Nakon dodavanja TBH došlo je do smanjenja oksidativnog skora u uzorcima: C25-12-Ch30, C22-13-Ch29, C21-16-Ch28, C7-20-Ch19, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21, C14-18-Ch24, 65-Ch2, Ch3, C11-51-Ch9, 62-Ch10, Ch13, dok je do povećanja oksidativnog skora došlo u uzorcima: C20-46-Ch27, C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C10-26-Ch-22 - C5-32-Ch18, C15-Ch1, C6-48-Ch4 - C17-63-Ch7, 66-Ch11, Ch12. U uzorku Ch8 nakon dodavanja antioksidansa nije došlo do promjene u vrijednostima oksidativnog skora. Poređenjem vrijednosti oksidativnog skora između jedinjenja u uzorcima sa oksidansom (TBH), uočavaju se značajno niže vrijednosti oksidativnog skora u halkonima: C25-12-Ch30, C22-13-Ch29, C21-16-Ch28, C7-20-Ch19, C8-22-Ch20, C9-54-Ch21 - C14-18-Ch24, 65-Ch2 - Ch13, u odnosu na ispitivane halkone: C20-46-Ch27, C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15, C3-23-Ch16, C15-Ch1. Jedinjenja: C20-46-Ch27 - C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15 - C14-18-Ch24 se statistički značajno razlikuju u poređenju sa TBH, dok se jedinjenja: C25-12-Ch30 - C16-14-Ch25, C12-17-Ch23, C19-19-Ch26, C2-21-Ch15 - C14-18-Ch24 statistički značajno razlikuju u poređenju sa DMSO.

Grafički prikaz je dat na slikama 48 i 49. Na slici 48 na box plotovima su prikazane medijane - , a čone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednosti oksidativnog skora između ispitivanih halkona su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 48. Grafički prikaz vrijednosti okski skora ispitivanih halkona

Na slici 49 na box plotovima su prikazane medijane - , a čeone stranice pravougaonika označavaju 25. i 75. percentil. Brojevima su označeni halkoni, a statistički značajne razlike u vrijednosti okski skora između ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH) su date kao broj iznad svakog box-plota.



Slika 49. Grafički prikaz vrijednosti okski skora ispitivanih halkona sa prooksidansom (TBH)

Najniže vrijednosti okski skora kod jedinjenja: C4-27-Ch17, C1-42-Ch14, C5-32-Ch18, C10-26-Ch-22 se objašnjavaju povećanjem elektronske gustine u molekulu usljed prisustva grupa

sa pozitivnim rezonantnim i induktivnim efektima (dodatna fenolna grupa u *orto* položaju), što pojačava njihove antioksidativne sposobnosti. Ovo je u skladu sa ranijim studijama prema kojima hidroksi halkoni imaju snažan inhibitorski efekat na formiranje superoksidnih anjona u neutrofilima pacova. Za antioksidativne osobine ovih jedinjenja zaslužno je prisustvo α , β -nezasićenog ketona i fenolnih grupa [148]. Jedinjenja: C4-27-Ch17, C1-42-Ch14, C5-32-Ch18, C10-26-Ch-22 derivati osnovne strukture II, pokazali su i nabolju anti-HIV proteaznu aktivnost (Tabela 16). Rezultati dobijeni u *in vitro* i *docking* eksperimentima ukazuju da upravo *orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama doprinosi i inhibitornoj aktivnosti halkona.

Vrijednosti oksidativne skorove su bile veće u slučajevima postojanja većeg broja halogena u samoj strukturi halkona (C12-17-Ch23, C9-54-Ch21, C16-14-Ch25), što se objašnjava time da grupe koje smanjuju elektronsku gustinu u molekulu umanjuju i antioksidativni potencijal halkonskog derivata. Kumar je u okviru svoje studije pokazao da grupe koje privlače elektrone, smanjuju efikasnost oslobađanja vodonika iz amino grupe pirazolina, a samim tim i antioksidativnu aktivnost [149]. Jedinjenje C16-14-Ch25 koje je imalo jednu od najvećih vrijednosti oksidativne skora ujedno pokazuje i najslabiju inhibitornu aktivnost (Tabela 16).

5. ZAKLJUČAK

1. Docking studije:

- Sprovedene *docking* studije ukazuju da elektronski efekti supstituenata na benzenovim prstenovima A i B osnovne 1,3-difenil propenonske strukture doprinose formiranju dodatnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu enzima i stabilizaciji kompleksa halkan-enzim i to:
 - *orto* disupstitucija prstena B fenolnim grupama kao proton akceptorskim grupama, koje grade vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta, a to ide u prilog podatku da povećanje broja vodoničnih veza smanjuje mogućnost mutacija virusa;
 - Supstitucija prstena A grupama sa jakim -I efektom (-F) kao i voluminoznim grupama sa jakim -I efektom (-CF₃) u velikoj mjeri doprinosi formiranju halogen interakcija i vodoničnih veza.

2. Sinteza propiofenonskih derivata (halkona):

- Na osnovu sprovedenih *docking* eksperimenata, a u cilju daljih bioloških ispitivanja izvršena je sinteza 17 novih mono- ili di- supstituisanih halkona reakcijom bazno katalizovane aldolne kondenzacije (*Claisen-Schmidt*-ova kondenzacija);
- Strukture sintetisanih jedinjenja su potvrđene IC, NMR i MS-MS spektroskopijom.

3. Određivanje lipofilnosti novosintetisanih halkona:

- Dobijeni rezultati (R_M , R_M^0 , S , C_0) pokazali su statistički značajnu linearnu zavisnost na šta ukazuju vrijednosti koeficijenta determinacije $R^2 > 0,98$. Visoki koeficijenti korelacije između R_M^0 i S ukazuju da testirana jedinjenja formiraju kongenerični skup i slični mehanizmi utiču na njihovo retenciono ponašanje. U svim hromatografskim sistemima primijećena je visoka korelacija između R_M^0 i S ($r = 0,87 - 0,97$), što je posljedica visokog stepena strukturne sličnosti ispitivanih jedinjenja i može se očekivati da u svakom primijenjenom sistemu u kome je stacionarna faza modifikovani silikagel postoje slični mehanizmi odgovorni za interakcije jedinjenja sa stacionarnom fazom (nespecifične hidrofobne interakcije). Na osnovu izračunatih R_M vrijednosti ispitivanih jedinjenja u sva tri hromatografska sistema može se zaključiti da je retencija ispitivanih jedinjenja najmanja u sistemu koji za organski modifikator ima etanol;
- Najveći stepen slaganja postoji između C_0 vrijednosti za hromatografski sistem acetonitril/voda i izračunatih $\text{Log}P$ vrijednosti (r vrijednost od 0,80 do 0,84) pa se jednačina koja opisuje ovu zavisnost može upotrijebiti za predviđanje retencije novih halkona. Sistem acetonitril/voda je odabran kao najpouzdaniji za detaljnije proučavanje odnosa između strukture i retencije kongenerisanih halkona.
- Formirana su tri QSRR modela. Izračunati statistički parametri, $r = 0,83$, $R^2_{\text{pred}} = 0,94$, $Q^2 = 0,68$ ukazuju da formirani SVM (C_0) model u poređenju sa MLR(C_0) i PLS(C_0) modelima pokazuje najbolju moć predviđanja i kao takav se može koristiti za predviđanje retencije i lipofilnosti novih strukturno sličnih jedinjenja. Za formiranje SVM (C_0) modela odabrana su tri deskriptora: *bcutp8*, *ATSp4* i *kappam2*;

4. *In vitro* ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih halkona

- Rezultati dobijeni u *in vitro* i *docking* eksperimentima ukazuju da *orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama kao i disupstitucija prstena A fluoro grupama doprinose inhibitornoj aktivnosti halkona. Fluor je mali atom koji slično vodoniku ne pravi sternu zaštitu, ali zbog svoje visoke elektronegativnosti doprinosi ostvarivanju jakih halogen interakcija i vodoničnih veza u aktivnom mjestu enzima pa time i inhibitornom efektu halkona.
- Rezultati ukazuju da je osnovna struktura II obećavajuća struktura za modifikacije i istraživanje u području anti-HIV-1 proteazne aktivnosti halkona.

5. Izvođenje studija kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva propiofenonskih derivata:

- Formiranje i validacija 3D-QSAR modela: Vrijednosti statističkih parametara $R^2 = 0,91$; $Q^2 = 0,55$; $RMSEE = 0,564$; $RMSEP = 0,871$; $R^2_{pred} = 0,677$ potvrđuju da formirani 3D-QSAR model ima dobru moć predviđanja i da se kao takav može primijeniti u dizajniranju novih jedinjenja sa boljom inhibitornom aktivnošću. Parametri r^2_m , $r^2_{m^2}$, r^2_m (vrijednost veća od 0,5) i parametar Δr^2_m (vrijednost manja od 0,2) kao parametri čije vrijednosti predstavljaju najstrožiji kriterijum eksterne validacije dodatno potvrđuju kvalitet formiranog modela u cilju identifikacije farmakofora sa najvećim uticajem na anti-HIV-1 proteaznu aktivnost.
- Najaktivnije jedinjenje iz data seta (C1-42-Ch14) poslužilo je kao *lead* jedinjenje za dizajniranje novih derivata halkona koji bi pokazivali bolju inhibitornu aktivnost prema HIV-1 proteazi. U dizajniranju su upotrijebljene dvije strategije:
 - Supstitucija sternog centra, vodonikovog atoma u *para* položaju prstena B koji učestvuje u formiranju pozitivne varijable v187 (TIP-TIP).
 - Modifikacija trifluorometil grupe koja učestvuje u formiranju pozitivnih varijabli v187 (TIP-TIP) i v466 (N1-TIP). Modifikacija podrazumijeva promjenu položaja ili / i supstituciju trifluorometil grupe, grupama koje će potencirati formiranje pozitivnih varijabli (v187 (TIP-TIP) i v466 (N1-TIP)), ali istovremeno spriječiti formiranje varijable v158 (TIP-TIP) sa negativnim uticajem na aktivnost.
- Na osnovu predviđenih ADMET osobina dizajnirana jedinjenja: D6, D9, E1, E2, E3, E4, F1 i F4 su izdvojena kao potencijalni kandidati za buduću sintezu i biološka ispitivanja.

6. Ispitivanje redoks aktivnosti novosintetisanih halkona u serumu zdravih ispitanika:

- Na osnovu dobijenih rezultata dolazi se do zaključka da halkoni posjeduju antioksidativnu aktivnost koja zavisi od vrste supstituenata.
- Da bi se dobilo jedinjenje sa potentnijim antioksidativnim dejstvom potrebno je sintetisati halkone sa više fenolnih ili sličnih grupa, a potrebno je izbjegavati supstituente poput halogena i grupa koje smanjuju elektronsku gustinu.
- *Orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama doprinosi i antioksidativnoj i anti-HIV-1 proteaznoj aktivnosti halkona.

6. LITERATURA

- [1] UNAIDS [homepage on the Internet] UNAIDS; c2020 [cited 2020 Jan 19]. Available from: <https://www.unaids.org/en>
- [2] Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):1-22
- [3] Mendell GL, Bennett JE, Dolin R. Churchill Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Livingstone: Elsevier; 2010. chapter 169
- [4] Louten J. Human Immunodeficiency Virus. In: *Essential Human Virology*. Academic Press; 2016. p. 193–211
- [5] Das Neves J. Novel Approaches for the Delivery of Anti-HIV Drugs—What Is New? *Pharmaceutics*. 2019;11(11):554
- [6] Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J, Kohli DV. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Curr Med Chem*. 2012;19:209–225
- [7] Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem*. 2007;42(2):125-137
- [8] Babasaheb PB, Shrikant SG, Ragini GB, Jalinder VT, Chandras NK. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:1364–1370
- [9] Ansari FL, Nazir S, Noureen H, Mirza B. Combinatorial synthesis and antibacterial evaluation of an indexed chalcone library. *Chem Biodivers*. 2005;2(12):1656-1664
- [10] Lahtchev KL, Batovska DI, Parushev SP, Ubiyovk VM, Sibirny AA. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. *Eur J Med Chem*. 2008;43(10):2220-2228
- [11] Dimmock JR, Kandepu NM, Hetherington M, Quail JW, Pugazhenth U, Sudom AM et al. Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. *J Med Chem*. 1998;41(7):1014-26
- [12] Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, Zhou LM, Nie W, Chen FC. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem*. 2002;10(8):2795-2802
- [13] Mateeva N, Eyunni SVK, Redda KK, Ononuju U, Hansberry TD, Aikens C, et al. Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(11):2350–2356
- [14] Cole AL, Hossain S, Cole AM, Phanstiel O. 4th Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem*. 2016;24(12):2768-2776
- [15] Gil del Valle L, Hernández RG, Ávila JP. Oxidative stress associated to disease progression and toxicity during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *J Virol. Microbiol*. 2013

- [16] Kirchner JT. The Origin, Evolution, and Epidemiology of HIV-1 and HIV-2. *Fundamentals of HIV Medicine 2017: (CME edition)*. New York: Oxford University Press; 2017. p. 17-23
- [17] Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Brutto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5-14
- [18] Greene WC. A history of AIDS: Looking back to see ahead. *Eur J Immunol*. 2007;37 (Suppl. 1):S94–S102
- [19] German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup ‘Assessment of Pathogens Transmissible by Blood’. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. *Transfus Med Hemother*. 2016;43:203–222
- [20] Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW, Swanstrom R, et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*. 2009;460(7256):711–716
- [21] Mushahwar IK. *Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Virology, pathogenesis, diagnosis and treatment*. *Perspectives in Medical Virology*. 2007;13:75–87
- [22] Cassis-Ghavami F, Curlin M, Geise R, Duerr A. *Human Immunodeficiency Virus*. In: *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Elsevier Inc; 2009. p. 441–468.
- [23] Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:394-407
- [24] Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*. 2005;34:233–244
- [25] Coffin J, Swanstrom R. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a012526
- [26] Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*. 2006;368(9534):489–504
- [27] Weber J. The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull*. 2001;58(1):61–72
- [28] Burton G. Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Seminars in Immunology*. 2002;14(4):275–284
- [29] Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *Aids*. 2009;23(2):147–160
- [30] Alimonti JB, Blake TB, FR Keith. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Journal of General Virology*. 2003;84:1649–1661
- [31] Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*. 2003;9:853–860

- [32] van Sighem AI, van de Wiel MA, Ghani AC, Jambroes M, Reiss P, Gyssens IC, et al. Mortality and progression to AIDS after starting highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2003;17(15):2227-2236
- [33] Pomerantz RJ. HIV patients receiving HAART therapy can still transmit the virus. Highly active antiretroviral chemotherapy. *Am Fam Physician*. 1999;59(10):2855-2856
- [34] Agrawal L, Lu X, Jin Q, Alkhatib G. Anti-HIV Therapy: Current and Future Directions. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(16):2031–2055
- [35] De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33(4):307–320
- [36] Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 1988;331:280–283
- [37] Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B et al. A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med*. 2007;4(1)e36
- [38] Wensing AMJ, van Maarseveen NM, Nijhuis M. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Research*. 2010;85(1):59–74
- [39] Mager PP. The Active Site of HIV-1 Protease. *Medicinal Research Reviews*. 2001;21(4):348-353
- [40] Navia MA, Fitzgerald MDP, Mckeever BM, Leu CT, Heimbach JC, Herber WK, et al. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*. 1989;337(6208):615–620
- [41] Wlodawer A, Miller M, Jaskolski M, Sathyanarayana B, Baldwin E, Weber IT, et al. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science*. 1989;245(4918):616–621
- [42] Wlodawer A, Vondrasek J. Inhibitors of HIV-1 protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design. *Ann Rev Biophys Biomol Struct*. 2009;27(1):249–284
- [43] Jaskolski M, Tomasselli AG, Sawyer TK, Staples DG, Heinrikson RL, Schneider J et al. Structure at 2.5-Å resolution of chemically synthesized human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry*. 1991;30:1600-1609
- [44] Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, Toth MV, Marshall GR, Clawson L et al. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science*. 1989;246:1149–1152
- [45] Swain AL, Miller MM, Green J, Rich DH, Schneider J, Kent SB, et al. X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate-based hydroxyethylamine inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(22):8805–8809

- [46] Brik A, Wong CH. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2002;1(1):5–14
- [47] Pokorná J, Machala L, Řezáčová P, Konvalinka J. Current and Novel Inhibitors of HIV Protease. *Viruses*. 2009;1(3):1209–1239
- [48] Ghosh AK, Osswald HL, Prato G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;59(11):5172–5208
- [49] Weber IT, Kneller DW, Wong-Sam A. Highly resistant HIV-1 proteases and strategies for their inhibition. *Future Med Chem*. 2015;7(8):1023–1038
- [50] Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber*. 1894;27:2985–2993
- [51] Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2003;32(1):335–373
- [52] Lamb ML, Jorgensen WL. Computational approaches to molecular recognition. *Curr Opin Chem Biol*. 1997;1:449-457
- [53] Gschwend DA, Good AC, Kuntz ID. Molecular docking towards drug discovery. *J Mol Recognit*. 1996;9:175-186
- [54] Tripathi A, Misra K. Molecular Docking: A Structure- Based Drug Designing Approach. *JSM Chem*. 2017;5(2):1042
- [55] Dar AM, Mir S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech*. 2017;8(2):8–10
- [56] Huang SY, Zou X. Advances and challenges in Protein-ligand docking. *Int J Mol Sci*. 2010;11(8):3016–3034
- [57] Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2011;7(2):146–157
- [58] Kuhl FS, Crippen GM, Friesen DK. A combinatorial algorithm for calculating ligand binding. *J Comput Chem*. 1984;5:24–34
- [59] Pearce BC, Langley DR, Kang J, Huang H, Kulkarni A. E-novo: an automated workflow for efficient structure-based lead optimization. *J Chem Inf Model*. 2009;49:1797–1809
- [60] Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev*. 2014;6(1):75–87
- [61] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*. 1998;19:1639-1662
- [62] Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*. 2003;52:609-623

- [63] Teodoro ML, Kavraki LE. Conformational flexibility models for the receptor in structure based drug design. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1635-1648
- [64] Totrov M, Abagyan R. Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: A practical alternative. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18:178-184
- [65] Gaba M, Gaba P, Singh S, Gupta GD. An overview on molecular docking. *Int J Drug Dev & Res.* 2010;2(2):219–231
- [66] Apostolakis J, Pluckthun A, Caflisch A. Docking small ligands in flexible binding sites. *J Comput Chem.* 1998;19:21-37
- [67] Lock C. *Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock.* 2017;1–9
- [68] Trott O, Olson AJ. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31:455–461
- [69] Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev.* 2017;9(2):91–102
- [70] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5th ed. Oxford: Clarendon Press. 2015
- [71] Dimmock JR, Elias DW, Beazely MA, Kandepu NM. Bioactivities of chalcones. *Curr Med Chem.* 1999;6(12):1125-1149
- [72] Zhou B, Xing C. Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. *Med Chem.* 2015;5:388–404
- [73] Mateeva N, Eyunni SVK, Redda KK, Ononuju U, Hansberry TD, Aikens C, et al. Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(11):2350–2356
- [74] Wan Z, Hu D, Li P, Xie D, Gan X. Synthesis, Antiviral Bioactivity of Novel 4-Thioquinazoline Derivatives Containing Chalcone Moiety. *Molecules.* 2015;20(7):11861–11874
- [75] Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Subhadhirasakul S, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorg Med Chem.* 2006;14:1710-1714
- [76] Wu JH, Wang XH, Yi YH, Lee KH. Anti-AIDS agents 54, A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13:1813-1815
- [77] Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Alternative measures of lipophilicity: From octanol-water partitioning to IAM retention. *J Pharm Sci.* 2008;97:2984-3004
- [78] Pliška V, Testa B, van de Waterbeemd H. Lipophilicity: The Empirical Tool and the Fundamental Objective. An Introduction. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* 2008:1–6

- [79] Smith DA, Jones B, Walker DK. Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics. *Med Res Rev.* 1996;16:243-266
- [80] Di L, Kerns EH. Lipophilicity. In: *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. 2nd ed. Academic Press; 2016. p. 39–50
- [81] Di L, Kerns EH. Lipophilicity Methods. In: *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. 2nd ed. Academic Press; 2016. p. 299–306
- [82] Tute MS. Lipophilicity: A History. In: In: Pliška V, Testa B, van de Waterbeemd H. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1996. p. 7–26
- [83] Marciniak K, Boryczka S. Chromatographic and Computational Assessment of Lipophilicity of New Anticancer Acetylenequinoline Derivatives. *Journal of Chromatographic Science.* 2017;55(9):934–939
- [84] Wang QS, Zhang L. Review of research on quantitative structure-retention relationships in thin-layer chromatography. *J Liq Chrom Relat.Tech.* 1999;22:1-14
- [85] Kubinyi H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 1993
- [86] Bate-Smith EC, Westall RG. Chromatographic behavior and chemical structure in some naturally occurring phenolic substances. *Biochem Biophys Acta.* 1950;4:427-440.
- [87] Cserhádi T. Determination of the lipophilicity of some aniline derivatives by reversed-phase thin-layer chromatography. The effect of the organic phase in the eluent. *Chromatographia.* 1984;18:318-322
- [88] Dross K, Sonntag C, Mannhold R. Determination of the hydrophobicity parameter R_{Mw} by reversed-phase thin-layer chromatography. *J Chromatogr A.* 1994;973:113-124
- [89] Lamparczyk H, Atomura M, Jinno K. Qualitative description of dispersive and inductive electrostatic interactions in reversed-phase liquid chromatography. *Chromatographia.* 1987;23:752–759
- [90] Poole SK, Poole CF. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;797(1-2):3-19
- [91] Lanin SN, Nikitin YS. Molecular interactions in liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1991;537:33-49
- [92] Hersey A, Hill AP, Hyde RM, Livingstone DJ. Principles of Method Selection in Partition Studies. *Quant Struct-Act Relat.* 1989;8:288-296
- [93] Chen Z, Weber SG. High-throughput method for lipophilicity measurement. *Anal Chem.* 2007;79:1043-1049

- [94] Kujawski J, Popielarska H, Myka A, Drabińska B, Bernard MK. The log P Parameter as a Molecular Descriptor in the Computer-aided Drug Design – an Overview. *Computational Methods in Science and Technology*. 2012;18(2):81-88
- [95] Martin AJP. Some theoretical aspects of partition chromatography. *Biochem Soc Symp*. 1950;3:4-20
- [96] Heberger K. Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *J Chromatogr*. 2007;1158:273-305
- [97] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70:257–265
- [98] Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:222–230
- [99] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:97–112
- [100] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44–84
- [101] Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153:1251–1256
- [102] Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999;65:1865–1874
- [103] Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258:1898–1902
- [104] Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1716–1723.
- [105] Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. *Biohemija Slobodnih Radikala*. Niš: Medicinski fakultet; 2000
- [106] Sonnerborg A, Carlin G, Akerlund B, Jarstrand C. Increased Production of Malondialdehyde in Patients with HIV Infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1988;20:287-290
- [107] Awodele O, Olayemi SO, Nwite JA, Adeyemo TA. Investigation of the Levels of Oxidative Stress Parameters in HIV and HIV-TB Co-Infected Patients. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2012;6(1):79-85
- [108] Wanchu A, Rana SV, Pallikkuth S, Sachdeva RK. Oxidative Stress in HIV-Infected Individuals: A Cross-Sectional Study. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2009;25:1307–1311

- [109] Ivanov A, Valuev-Elliston V, Ivanova O. et al. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. vol. 2016. Article ID 8910396, 18 pages
- [110] Tabe FN, Yanou NN, Kamadje NAH, Ntso A-SA. Oxidative Stress Attenuation in HIV/AIDS Patients on Antiretroviral Drugs by Calyx Juice of Hibiscus sabdariffa. *J Dis Med Plants*. 2015;1:1-7
- [111] Babasaheb PB, Shrikant SG, Ragini GB, Jalinder VT, Chandrahas NK. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:1364-1370
- [112] Batovska DI. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current Clinical Pharmacology*. 2010;5:1-29
- [113] Graham LP. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2013. p. 215-226
- [114] Gareth T. *Medicinal Chemistry*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 75-109
- [115] Roy K, Kar S, Das RN. A Primer on QSAR/QSPR Modeling. *SpringerBriefs in Molecular Science*. 2015: 24-32. doi: 10.1007/978-3-319-17281-1
- [116] Todeschini R, Consonni V, Gramatica P. Chemometrics in QSAR. In: Brown S, Tauler R, Walczak R (eds) *Comprehensive chemometrics*, vol 4. Oxford: Elsevier; 2009. p. 129-172
- [117] Tute MS. History and objectives of quantitative drug design. In: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB (eds) *Comprehensive medicinal chemistry*, vol 4. Oxford: Pergamon Press; 1990. p. 1-31
- [118] Guha R, Willighagen E. A survey of quantitative descriptions of molecular structure. *Curr Top Med Chem*. 2012;12:1946-1956
- [119] Todeschini R, Consonni V. *Handbook of molecular descriptors*. Weinheim: Wiley-VCH; 2000
- [120] Livingstone DJ. The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey. *J Chem Inf Comput Sci*. 2000;40:195-209
- [121] Roy K, Kar S, Das RN. Chemical Information and Descriptors. In: *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. 1st ed. Academic Press; 2015. p. 47-80
- [122] Roy K, Kar S, Das RN. Introduction to 3D-QSAR. In: *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. 1st ed. Academic Press; 2015. p. 291-317
- [123] Pastor M, Cruciani G, McLay I, Pickett S, Clementi S. GRid-INdependent descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J Med Chem*. 2000;43(17):3233-3243

- [124] Durán Á, Zamora I, Pastor M. Suitability of GRIND-Based Principal Properties for the Description of Molecular Similarity and Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2009;49(9):2129–2138
- [125] Claisen L, Claparede A. Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*. 1881;14(1):2460–2468
- [126] Schmidt JG. Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl in Gegenwart von Alkalilauge. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*. 1881;14(1):1459–1461
- [127] Smith MB, March J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. 6th ed. New York: Wiley-Interscience. 2007. ISBN 0-471-72091-7
- [128] ChemDes [homepage on the Internet] Computational Biology & Drug Design Group, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University; c2020 [cited 2020 Oct 3]. Available from: http://www.scbdd.com/chemopy_desc/index/
- [129] Dong J, Cao DS, Miao HY, Liu S, Deng BC, Yun YH, et al. ChemDes: an integrated web-based platform for molecular descriptor and fingerprint computation. *J Cheminformatics*. 2015;7:60
- [130] Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol*. 2003;21(11):1387–1395
- [131] Sekar RB, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*. 2003;160:629–633
- [132] Windsor IW, Raines RT. Fluorogenic Assay for Inhibitors of HIV-1 Protease with Sub-picomolar Affinity. *Sci Rep*. 2015;5:11286
- [133] Durán Á, Martínez GC, Pastor M. Development and Validation of AMANDA, a New Algorithm for Selecting Highly Relevant Regions in Molecular Interaction Fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2008;48(9):1813–1823
- [134] Durán Á, Zamora I, Pastor M. Suitability of GRIND-Based Principal Properties for the Description of Molecular Similarity and Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2009;49(9):2129–2138
- [135] Ojha PK, Mitra I, Das RN, Roy K. Further exploring rm2 metrics for validation of QSPR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2011;107(1):194–205
- [136] Roy K, Mitra I, Kar S, Ojha PK, Das RN, Kabir H. Comparative Studies on Some Metrics for External Validation of QSPR Models. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012;52(2):396–408
- [137] Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models. 2014; OECD Series on Testing and Assessment. doi: 10.1787/9789264085442-en

- [138] Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, et al. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*. 2015;241:192–198
- [139] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38:1103–1111
- [140] Kuchar M, Kraus E, Jelinkova M. Influence of mobile phase composition on evaluation of lipophilicity by partition chromatography. *Journal of Chromatography*. 1991;557(1-2):399-411
- [141] Snyder LR. Classification of the solvent properties of common liquids. *J Chromatogr*. 1974;A92:223-230
- [142] Burden FR. Molecular identification number for substructure searches. *J Chem Inf Comput Sci*. 1989;29:225–227
- [143] Burden FR. A chemically intuitive molecular index based on the eigenvalues of a modified adjacency matrix. *Quant Struct-Act Relat*. 1997;16:309–314
- [144] Kang YK, Jhon MS. Additivity of atomic static polarizabilities and dispersion coefficients. *Theor Chim Acta*. 1982;61:41–48
- [145] Takaku T, Nagahori H, Sogame Y, Takagi T. Quantitative structure–activity relationship model for the fetal–maternal blood concentration ratio of chemicals in humans. *Biol Pharm Bull*. 2015;38:930–934
- [146] Hajimahdi Z, Safizadeh F, Zarghi A. QSAR analysis for some 1, 2-benzisothiazol-3-one derivatives as caspase-3 inhibitors by stepwise MLR method. *Iran J Pharm Res*. 2016;15:439–448
- [147] Madden JC. Introduction to QSAR and other in silico methods to predict toxicity. In: Cronin MTD, Madden JC (eds). *In silico toxicology: Principles and Applications*. Cambridge: RSC Publishing; 2011. p. 11-30
- [148] Ni L, Meng CQ, Sikorsk JA. Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opin Ther Patents*. 2004;14(12):1669-1691
- [149] Akshay K, Varadaraj BG, Singla RK. Synthesis and evaluation of antioxidant activity of novel 3,5-disubstituted-2-pyrazolines. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2013;51(2):167-173

7. PRILOZI

Tabela 1. Parametri lipofilnosti određeni u primijenjenim RP-TLC sistemima

Jedinjenje	Acetonitril–voda 50:50		Acetonitril–voda 60:40		Acetonitril–voda 70:30		Acetonitril–voda 80:20		R _M ⁰	S	C ₀
	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M			
C25-12-Ch30	0,02190	1,64998	0,07143	1,11394	0,12319	0,85234	0,24324	0,49292	3,4536	-0,0373	92,5898
C22-13-Ch29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16-14-Ch25	0,02720	1,55630	0,08966	1,00663	0,15278	0,74394	0,31469	0,33801	3,4576	-0,0392	88,2041
C21-16-Ch28	0,02098	1,66901	0,06667	1,14613	0,14189	0,78158	0,27027	0,43136	3,6574	-0,0408	89,6422
C12-17-Ch23	0,02740	1,55023	0,08054	1,05754	0,18367	0,64782	0,32667	0,31413	3,5691	-0,0412	86,6286
C14-18-Ch24	0,02740	1,55023	0,08725	1,01960	0,18243	0,65142	0,35065	0,26761	3,6126	-0,0422	85,6066
C19-19-Ch26	0,02941	1,51851	0,12143	0,85946	0,22628	0,53394	0,39189	0,19081	3,5763	-0,0431	82,9768
C7-20-Ch19	0,02759	1,54716	0,06579	1,15229	0,14474	0,77152	0,30000	0,36798	3,5066	-0,0392	89,4541
C2-21-Ch15	0,02222	1,64345	0,06850	1,13349	0,16058	0,71828	0,30405	0,35962	3,7371	-0,0427	87,5199
C8-22-Ch20	0,02740	1,55023	0,08725	1,01960	0,16216	0,71321	0,31373	0,33995	3,4649	-0,0394	87,9416
C3-23-Ch16	0,01379	1,85431	0,05333	1,24920	0,11842	0,87183	0,27083	0,43012	4,1238	-0,0465	88,6839
C20-46-Ch27	0,01449	1,83251	0,06250	1,17609	0,12319	0,85234	0,24324	0,49292	3,9111	-0,0434	90,1175
C24-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6-48-Ch4	0,03378	1,45637	0,10417	0,93450	0,20139	0,59830	0,34868	0,27136	3,3444	-0,0389	85,9743
C11-51-Ch9	0,02703	1,55630	0,08333	1,04139	0,16667	0,69897	0,30263	0,36255	3,4652	-0,0392	88,3980
C13-52-Ch6	0,02703	1,55630	0,08163	1,05115	0,16552	0,70257	0,30921	0,34909	3,4954	-0,0397	88,0453
C9-54-Ch21	0,01370	1,85733	0,05369	1,24613	0,13014	0,82505	0,25000	0,47712	4,0665	-0,0456	89,1776
62-Ch10	0,02797	1,54095	0,07639	1,08246	0,18056	0,65691	0,32168	0,32401	3,5507	-0,0408	87,027
C17-63-Ch7	0,03472	1,44404	0,10490	0,93112	0,21528	0,56172	0,37500	0,22185	3,4131	-0,0404	84,4827
65-Ch2	0,04196	1,35857	0,12766	0,83463	0,23239	0,51891	0,40972	0,15857	3,2629	-0,0392	83,2372
66-Ch11	0,02778	1,54407	0,08571	1,02803	0,18440	0,64572	0,33333	0,30103	3,5521	-0,0411	86,4258

Jedinjenje	Aceton–voda 50:50		Aceton–voda 60:40		Aceton–voda 70:30		Aceton–voda 80:20		R _M ⁰	S	C ₀
	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M			
C25-12-Ch30	0,00710	2,14565	0,02160	1,65606	0,07090	1,11742	0,20280	0,59450	4,7533	-0,0519	91,5857
C22-13-Ch29	0,00350	2,45484	0,02128	1,66276	0,07246	1,10721	0,21127	0,57210	5,4817	-0,0620	88,4145
C16-14-Ch25	0,00699	2,15229	0,03546	1,43457	0,10145	0,94729	0,27143	0,42882	4,9182	-0,0566	86,8940
C21-16-Ch28	0,00676	2,16732	0,03448	1,44716	0,10145	0,94729	0,24265	0,49432	4,8513	-0,0552	87,8859
C12-17-Ch23	0,00676	2,16732	0,02143	1,65960	0,11765	0,87506	0,29412	0,38021	5,2654	-0,0615	85,6163
C14-18-Ch24	0,00699	2,15229	0,03521	1,43775	0,12319	0,85234	0,29197	0,38471	5,0341	-0,0589	85,4686
C19-19-Ch26	0,00710	2,14565	0,02880	1,52792	0,10640	0,92420	0,24820	0,48130	4,9077	-0,0560	87,6375
C7-20-Ch19	0,00676	2,16732	0,04110	1,36798	0,09559	0,97596	0,25899	0,45653	4,8328	-0,0552	87,5507
C2-21-Ch15	0,00710	2,14565	0,02880	1,52792	0,09290	0,98964	0,24110	0,49799	4,8531	-0,0548	88,5602
C8-22-Ch20	0,00699	2,15229	0,04196	1,35857	0,11268	0,89625	0,29412	0,38021	4,9529	-0,0578	85,6903
C3-23-Ch16	0,00676	2,16732	0,02740	1,55023	0,08955	1,00718	0,25000	0,47712	4,9493	-0,0561	88,2228
C20-46-Ch27	0,00710	2,14565	0,02113	1,66589	0,07250	1,10698	0,25185	0,47284	4,9731	-0,0558	89,1237
C24-47	0,00710	2,14565	0,03010	1,50816	0,14180	0,78191	0,28080	0,40845	5,0706	-0,0594	85,3636
C6-48-Ch4	0,00710	2,14565	0,04450	1,33187	0,12860	0,83098	0,27400	0,42319	4,8673	-0,0567	85,8430
C11-51-Ch9	0,00710	2,14565	0,03700	1,41542	0,10790	0,91739	0,26710	0,43837	4,8821	-0,0562	86,8701
C13-52-Ch6	0,00710	2,14565	0,03680	1,41787	0,10790	0,91739	0,24830	0,48107	4,8117	-0,0549	87,6448
C9-54-Ch21	0,00710	2,14565	0,02190	0,02190	0,07910	1,06604	0,22070	0,54790	4,8475	-0,0538	90,1022
62-Ch10	0,00699	2,15229	0,03497	1,44091	0,86992	0,86992	0,28676	0,39571	5,0112	-0,0584	85,8082
C17-63-Ch7	0,01049	1,97467	0,04861	1,29162	0,13699	0,79934	0,32353	0,32034	4,6424	-0,0546	85,0256
65-Ch2	0,01439	1,83569	0,04286	1,34895	0,11972	0,86646	0,17931	0,66057	3,8105	-0,0405	94,0864
66-Ch11	0,01439	1,83569	0,03623	1,42488	0,11268	0,89625	0,23129	0,52160	4,0757	-0,0447	91,1789

Jedinjenje	Etanol–voda 50:50		Etanol–voda 60:40		Etanol–voda 70:30		Etanol–voda 80:20		R_M^0	S	C_0
	R_f	R_M	R_f	R_M	R_f	R_M	R_f	R_M			
C25-12-Ch30	0,01430	1,83841	0,03600	1,42777	0,13290	0,81454	0,27780	0,41493	4,2983	-0,0488	88,0799
C22-13-Ch29	0,01361	1,86034	0,05674	1,22076	0,12319	0,85234	0,27857	0,41326	4,1480	-0,0471	88,0679
C16-14-Ch25	0,02740	1,55023	0,08451	1,03476	0,18705	0,63811	0,35915	0,25147	3,6590	-0,0429	85,2914
C21-16-Ch28	0,02759	1,54716	0,08392	1,03809	0,17143	0,68425	0,33803	0,29189	3,5681	-0,0412	86,6044
C12-17-Ch23	0,03497	1,44091	0,10417	0,93450	0,19718	0,60975	0,38298	0,20713	3,4150	-0,0403	84,7395
C14-18-Ch24	0,04225	1,35539	0,09790	0,96446	0,20280	0,59451	0,38298	0,20713	3,2600	-0,0381	85,5643
C19-19-Ch26	0,02810	1,53892	0,08700	1,02095	0,24820	0,48130	0,45200	0,08364	3,9698	-0,0491	80,8513
C7-20-Ch19	0,02878	1,52827	0,09155	0,99665	0,18750	0,63682	0,41429	0,15039	3,7488	-0,0449	83,4922
C2-21-Ch15	0,01390	1,85091	0,05800	1,21062	0,18570	0,64197	0,34010	0,28787	4,4154	-0,0526	83,9430
C8-22-Ch20	0,03472	1,44404	0,10000	0,95424	0,21583	0,56031	0,39041	0,19352	3,4826	-0,0415	83,9180
C3-23-Ch16	0,02778	1,54407	0,07143	1,11394	0,16901	0,69167	0,35417	0,26091	3,6793	-0,0427	86,1663
C20-46-Ch27	0,01390	1,85091	0,04410	1,33597	0,14710	0,76329	0,28380	0,40202	4,2856	-0,0492	87,1057
C24-47	0,04220	1,35596	0,10290	0,94043	0,24820	0,48130	0,41890	0,14214	3,3953	-0,0410	82,8122
C6-48-Ch4	0,04200	1,35812	0,09560	0,97590	0,24460	0,48972	0,41890	0,14214	3,4286	-0,0413	83,0169
C11-51-Ch9	0,02110	1,66646	0,08700	1,02095	0,19720	0,60970	0,36490	0,24067	3,9320	-0,0469	83,8380
C13-52-Ch6	0,02860	1,53103	0,07970	1,06247	0,19720	0,60970	0,39730	0,18098	3,7729	-0,0450	83,8422
C9-54-Ch21	0,01450	1,83229	0,05800	1,21062	0,16670	0,69887	0,34720	0,27420	4,3749	-0,0519	84,2948
62-Ch10	0,02797	1,54095	0,07746	1,07588	0,17483	0,67394	0,33803	0,29189	3,5926	-0,0415	86,5687
C17-63-Ch7	0,04225	1,35539	0,11972	0,86646	0,22069	0,54793	0,40426	0,16840	3,2562	-0,0388	83,9227
65-Ch2	0,04348	1,34242	0,11429	0,88930	0,21918	0,55175	0,40714	0,16320	3,2556	-0,0388	83,9072
66-Ch11	0,02857	1,53148	0,08571	1,02803	0,17123	0,68485	0,34286	0,28255	3,5402	-0,0409	86,5575

Tabela 2. Izračunate Log*P* vrijednosti za ispitivana jedinjenja – korelacija sa eksperimentalnom vrijednošću

Acetonitril - voda							
Jedinjenje	Viswanadhan Log <i>P</i>	Broto Log <i>P</i>	Marvin Log <i>P</i>	ACD/Chem Sketch Log <i>P</i>	CD CLog <i>P</i>	Crippen Log <i>P</i>	Eksperimentalna C ₀
L12-A14	4,57	4,33	5,59	5,26	5,65	4,47	92,59
L13-A15	4,43	4,20	5,44	4,91	5,38	4,31	91,95
C16-L14-A16	4,57	4,33	5,59	5,40	5,65	4,47	88,20
L16-A17	4,05	3,72	4,98	4,87	4,94	3,91	89,64
C12-L17-A18	3,67	3,23	4,52	4,54	4,37	3,51	86,63
C14-L18-A19	3,67	3,23	4,52	4,61	4,37	3,51	85,61
C19-L19-A20	3,67	3,23	4,52	4,50	4,37	3,51	82,98
C7-L20-A21	4,41	4,08	5,26	5,46	5,11	4,27	89,45
C2-L21-A22	4,00	3,51	4,89	4,51	4,60	3,84	87,43
C8-L22-A23	4,00	3,51	4,89	4,47	4,60	3,84	87,94
C3-L23-A24	4,74	4,36	5,63	5,43	5,34	4,60	88,68
C20-L46-A25	4,43	4,20	5,44	4,77	5,38	4,31	90,12
L47	3,39	2,96	4,24	4,00	3,96	3,20	81,89
C6-L48-A4	4,27	3,94	5,11	4,96	4,84	4,12	85,97
C11-L51-A9	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	88,40
C13-L52-A6	4,00	3,51	4,89	4,47	4,60	3,84	88,05
L54-A26	4,47	3,93	5,41	4,93	5,10	4,33	89,18
L62-A10	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	87,03
C17-L63-A7	3,14	3,09	4,08	4,00	3,88	3,07	84,48
L65-A2	3,53	3,10	4,38	4,01	4,10	3,35	83,24
L66-A11	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	86,43
R ²	0,6318	0,6486	0,6809	0,4902	0,6975	0,6492	

Aceton - voda							
Jedinjenje	Viswanadhan Log <i>P</i>	Broto Log <i>P</i>	Marvin Log <i>P</i>	ACD/Chem Sketch Log <i>P</i>	CD CLog <i>P</i>	Crippen Log <i>P</i>	Eksperimentalna C ₀
L12-A14	4,57	4,33	5,59	5,26	5,65	4,47	91,59
L13-A15	4,43	4,20	5,44	4,91	5,38	4,31	88,41
C16-L14-A16	4,57	4,33	5,59	5,40	5,65	4,47	86,89
L16-A17	4,05	3,72	4,98	4,87	4,94	3,91	87,89
C12-L17-A18	3,67	3,23	4,52	4,54	4,37	3,51	85,62
C14-L18-A19	3,67	3,23	4,52	4,61	4,37	3,51	85,47
C19-L19-A20	3,67	3,23	4,52	4,50	4,37	3,51	87,64
C7-L20-A21	4,41	4,08	5,26	5,46	5,11	4,27	87,55
C2-L21-A22	4,00	3,51	4,89	4,51	4,60	3,84	88,56
C8-L22-A23	4,00	3,51	4,89	4,47	4,60	3,84	85,69
C3-L23-A24	4,74	4,36	5,63	5,43	5,34	4,60	88,22
C20-L46-A25	4,43	4,20	5,44	4,77	5,38	4,31	89,12
L47	3,39	2,96	4,24	4,00	3,96	3,20	85,36
C6-L48-A4	4,27	3,94	5,11	4,96	4,84	4,12	85,84
C11-L51-A9	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	86,87
C13—L52-A6	4,00	3,51	4,89	4,47	4,60	3,84	87,64
L54-A26	4,47	3,93	5,41	4,93	5,10	4,33	90,10
L62-A10	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	85,81
C17-L63-A7	3,14	3,09	4,08	4,00	3,88	3,07	85,03
L65-A2	3,53	3,10	4,38	4,01	4,10	3,35	94,09
L66-A11	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	91,18
R ²	0,0760	0,0552	0,0826	0,0094	0,0728	0,0711	

Etanol - voda							
Jedinjenje	Viswanadhan Log <i>P</i>	Broto Log <i>P</i>	Marvin Log <i>P</i>	ACD/Chem Sketch Log <i>P</i>	CD CLog <i>P</i>	Crippen Log <i>P</i>	Eksperimentalna C ₀
L12-A14	4,57	4,33	5,59	5,26	5,65	4,47	88,08
L13-A15	4,43	4,20	5,44	4,91	5,38	4,31	88,07
C16-L14-A16	4,57	4,33	5,59	5,40	5,65	4,47	85,29
L16-A17	4,05	3,72	4,98	4,87	4,94	3,91	86,60
C12-L17-A18	3,67	3,23	4,52	4,54	4,37	3,51	84,74
C14-L18-A19	3,67	3,23	4,52	4,61	4,37	3,51	85,56
C19-L19-A20	3,67	3,23	4,52	4,50	4,37	3,51	80,85
C7-L20-A21	4,41	4,08	5,26	5,46	5,11	4,27	83,49
C2-L21-A22	4,00	3,51	4,89	4,51	4,60	3,84	83,94
C8-L22-A23	4,00	3,51	4,89	4,47	4,60	3,84	83,92
C3-L23-A24	4,74	4,36	5,63	5,43	5,34	4,60	86,17
C20-L46-A25	4,43	4,20	5,44	4,77	5,38	4,31	87,11
L47	3,39	2,96	4,24	4,00	3,96	3,20	82,81
C6-L48-A4	4,27	3,94	5,11	4,96	4,84	4,12	83,02
C11-L51-A9	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	83,84
C13—L52-A6	4,00	3,51	4,89	4,47	4,60	3,84	83,84
L54-A26	4,47	3,93	5,41	4,93	5,10	4,33	84,29
L62-A10	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	86,57
C17-L63-A7	3,14	3,09	4,08	4,00	3,88	3,07	83,92
L65-A2	3,53	3,10	4,38	4,01	4,10	3,35	83,91
L66-A11	3,86	3,38	4,75	4,46	4,46	3,68	86,56
R ²	0,2169	0,2710	0,2691	0,1376	0,3190	0,3248	

Tabela 3. Vrijednosti koeficijenata molekulskih deskriptora

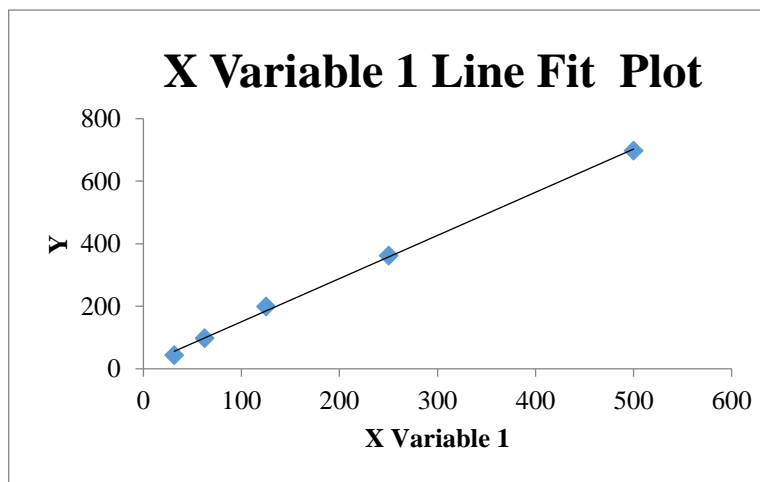
Jedinjenje	C ₀	ATSp4	bcutp8	kappam2
12-Ch14	92,5898	3,073	1,991	6,075
13-Ch15	91,9484	2,982	1,990	5,914
C16-14-Ch16	88,2041	3,014	1,990	6,075
16-Ch17	89,6422	2,867	1,974	5,673
C12-17-Ch18	86,6286	2,757	1,955	5,436
C14-18-Ch19	85,6066	2,757	1,956	5,436
C19-19-Ch20	82,9768	2,737	1,955	5,436
C7-20-Ch21	89,4541	2,995	2,161	6,009
C2-21-Ch22	87,5199	2,808	2,207	5,482
C8-22-Ch23	87,9416	2,788	2,206	5,482
C3-23-Ch24	88,6839	3,035	2,298	6,053
C20-46-Ch25	90,1175	3,043	1,991	5,914
47	82,2703	2,673	1,956	5,122
C6-48-Ch4	85,9743	2,856	2,161	5,828
C11-51-Ch9	88,3980	2,802	2,170	5,321
C13-52-Ch6	88,0453	2,840	2,170	5,482
54-Ch26	89,1776	2,922	2,302	5,697
62-Ch10	87,0270	2,802	2,168	5,321
C17-63-Ch7	84,4827	2,912	2,403	5,866
65-Ch2	83,2372	2,694	1,955	5,274
66-Ch11	86,4258	2,740	2,170	5,321

Tabela 4. Dobijene vrijednosti RFU i statistički podaci za kalibracionu krivu za *in vitro* ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti

Standard EDANS	RFU
500,00	698,00
250,00	361,50
125,00	301,50
62,50	217,00
31,50	203,50

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,999272
R Square	0,998544
Adjusted R Square	0,998058
Standard Error	11,59796
Observations	5



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	276681,5	276681,5	2056,917	2,36E-05
Residual	3	403,5381	134,5127		
Total	4	277085			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	12,50622	7,854237	1,592289	0,209562	-12,4895	37,5019	-12,4895	37,5019
X Variable 1	1,380257	0,030433	45,35324	2,36E-05	1,283404	1,47711	1,283404	1,47711

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	702,6347	-4,63465
2	357,5704	3,929564
3	185,0383	14,46167
4	98,77227	-1,27227
5	55,98431	-12,4843

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
10	43,5
30	97,5
50	199,5
70	361,5
90	698,0

**8. BIOGRAFIJA AUTORA I
SPISAK PUBLIKOVANIH
RADOVA I SAOPŠTENJA**

Biografija autora

Nemanja Turković je rođen 09.03.1989. godine u Baru, gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju kao nosilac diplome „Luča“.

Diplomirao je na Farmaceutskom fakultetu u Podgorici 2013. godine, sa prosječnom ocjenom A (10.00).

Dobitnik je više nagrada i stipendija, među kojima treba izdvojiti: najviše državno priznanje za svršene studente - Plaketu Univerziteta Crne Gore za najboljeg studenta iz oblasti tehničkih, prirodno-matematičkih i medicinskih nauka za 2013/2014. godinu, Studentsku nagradu glavnog grada Podgorice za najbolje studente 2009. godine, stipendiju Fondacije „Ljubica i Tomo Lompar“, Atlas stipendiju 2013, stipendiju Ministarstva prosvjete i nauke za talentovane studente, stipendiju grada Bara za talentovane studente itd.

Doktorske studije na Farmaceutskom fakultetu – Univerzitet u Beogradu, modul Farmaceutska hemija je upisao 2016. godine.

Živi u Podgorici gdje radi u Institutu za lijekove i medicinska sredstva (CInMED) u Odjeljenju za uvoz/izvoz lijekova i stručna mišljenja.

Kao saradnik u nastavi angažovan je na Medicinskom fakultetu u Podgorici – studijski program Farmacija, na predmetu Farmaceutska hemija I.

Spisak publikovanih radova i saopštenja

Publikovani radovi

Radovi publikovani u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

Janković T, **Turković N**, Kotur-Stevuljević J, Vujić Z, Ivković B. Differences in antioxidant potential of chalcones in human serum: In vitro study. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 324: 109084

DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109084

Radovi publikovani u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

Turković N, Ivković B, Kotur-Stevuljević J, Tasić M, Marković B, Vujić Z. Molecular Docking, Synthesis and anti-HIV-1 protease Activity of Novel Chalcones. *Current Pharmaceutical Design*. 2020; 26(8): 802-814

DOI: 10.2174/1381612826666200203125557

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima (M23):

Dobričić V, **Turković N**, Ivković B, Csuvić O, Vujić Z. Evaluation of the lipophilicity of chalcones by RP-TLC and computational methods. *JPC-J Planar Chromat*. 2020; 33: 245-253

DOI: 10.1007/s00764-020-00029-w

Saopštenja

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34):

Turković N, Ivković B, Dimitrijević B, Kovačević I, Novaković R, Dragović Lukić G, Vujić Z. Validation of RP HPLC method for quantitative analysis of antiretroviral drugs in human

plasma samples, The 40th Symposium chromatographic methods of investigating the organic compounds, Katowice - Szczyrk, Poland, May 23rd - 26th, 2017.

Ivković B, **Turković N**, Marković M, Vujić Z. Synthesis and biological activity of propionophenone derivatives, VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, *Zajedno stvaramo budućnost farmacije*, Beograd, Srbija, 10-14. oktobar 2018.

Turković N, Tasić M, Ivković B, Kotur-Stevuljević J, Vujić Z. *In silico* and *in vitro* testing of anti-HIV protease activity of newly synthesized propiophenone derivatives. Kongres farmaceuta u Bosni i Hercegovini sa međunarodnim učešćem, Sarajevo, Federacija Bosne i Hercegovine, 10-13. oktobar 2019.

Turković N, Ivković B, Marković B, Božović Ž, Vujić Z. Docking studies of new HIV-1 protease inhibitors. The Third Congress of Pharmacists of Montenegro with International Participation, Bečići, Budva, Crna Gora, 9-12. maj 2019. S244

9. IZJAVE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Немања Турковић

Број индекса 35/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Дизајнирање, синтеза и *in vitro* испитивања деривата пропиофенона као
потенцијалних инхибитора ензима ХИВ-1 протеазе“

- резултат сопственог истраживачког рада
- да је дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа
- да су резултати коректно наведени
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица

Потпис аутора

У Београду, 14.02.2021.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Немања Турковић**

Број индекса **35/2016**

Студијски програм **Фармацеутске науке, модул: Фармацеутска хемија**

Наслов рада **„Дизајнирање, синтеза и *in vitro* испитивања деривата пропниофенона као потенцијалних инхибитора ензима ХИВ-1 протеазе“**

Ментор **Др сц. Зорица Вујић, редовни професор, Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет**
Др сц. Бранка Ивковић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве, моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци се могу објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, **14.02.2021.**

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом

**„Дизајнирање, синтеза и *in vitro* испитивања деривата пропиофенона као
потенцијалних инхибитора ензима ХИВ-1 протеазе“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одбраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство -некомерцијално (CC BY -NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY- NC-ND)
4. Ауторство– некомерцијално – делити под истим условима (CC BY- NC- SA)
5. Ауторство– без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство делити под истим условима (CC BY-SA)

Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14.02.2021.

1. **Ауторство.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употреба дела у свом делу, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце ако се прерада дистрибуира по истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употреба дела у свом делу, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце.
6. **Ауторство делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.