



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

**Милена Д. Вукић**

**Биолошка активност изолованих нафтохинона и  
екстраката ризома биљке *Onosma visianii* Clem**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

Ментор: др Ненад Вуковић, ванредни професор

Крагујевац, 2020.

<b><i>I. Аутор</i></b>	
Име и презиме:	Милена Вукић
Датум и место рођења:	23.03.1990., Крагујевац
Садашње запослење:	Истраживач-сарадник
Наслов:	Биолошка активност изолованих нафтохинона и екстраката ризома биљке <i>Onosma visianii</i> Clem
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>	
Број страница:	208
Број слика:	106
Број библиографских података:	213
Установа и место где је рад израђен:	Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК):	Хемија – Биохемија (577.1)
Ментор:	др Ненад Вуковић, ванредни професор
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме:	15.11.2017. (одлука бр. IV-01-1041/8)
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	<p>1. др Ненад Вуковић, ванредни професор (ментор) Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу <i>Ужа научна област:</i> Биохемија</p> <p>2. др Дејан Орчић, ванредни професор Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду <i>Ужа научна област:</i> Биохемија</p> <p>3. др Веле Тешевић, редовни професор Хемијски факултет, Универзитет у Београду <i>Ужа научна област:</i> Органска хемија</p> <p>4. др Снежана Марковић, доцент Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу <i>Ужа научна област:</i> Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија</p> <p>5. др Владимир Михаиловић, доцент Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; <i>Ужа научна област:</i> Биохемија</p>

<p>Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:</p>	<p>1. др Веле Тешевић, редовни професор (председник Комисије) Хемијски факултет у Београду, Универзитет у Београду <i>Ужа научна област:</i> Органска хемија</p> <p>2. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу <i>Ужа научна област:</i> Имунологија и микробиологија</p> <p>3. др Милан Младеновић, ванредни професор Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу <i>Ужа научна област:</i> Биохемија</p> <p>4. др Владимир Михаиловић, доцент Природно-математички факултет у Крагујевцу Универзитет у Крагујевцу <i>Ужа научна област:</i> Биохемија</p> <p>5. Др Марија Анђелковић, доцент Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу <i>Ужа научна област:</i> Биохемија</p>
<p>Датум одбране дисертације:</p>	<p>2020. година</p>



*Мојим родитељима*





## Захвалница

*Ова докторска дисертација рађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу (део је пројекта који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат: ОИ142016) под менторским руководством др Ненада Л. Вуковића, ванредног професора Природно-математичког факултета у Крагујевцу, који је и предложио тему за овај рад. Искрено се захваљујем ментору на идејама, саветима, указаној помоћи и подрици током израде и писања свих радова, као и ове докторске дисертације.*

*Захваљујем се члановима комисије, на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе као и на доприносу који су дали својим сугестијама и саветима приликом израде ове дисертације. Овом приликом се захваљујем Ани Обрадовић истраживачу-сараднику Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу и др Сузи Поповић, научном сараднику Факултета медицинских наука у Крагујевцу за несебичну помоћ приликом израде експеримената за одређивање цитотоксичне активности.*

*Захваљујем се и колегама Института за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на подрици и пријатељству. Посебно се захваљујем др Марији Јеремић, Јелени Петронијевић, Ненаду Јоксимовићу и девојкама из лабораторије Б-0-2 на свој подрици, саветима, смеху, разговорима уз јутарње кафе, а посебно хвала за то што сте учинили да се осећам као део једне „истраживачке групе“.*

*Хвала свим мојим пријатељима! Посебно хвала Невени Јанићијевић (Павловој мами), Александру Ристићу (Братунгици), Јовану Јокановићу и Анђели Милојевић који су са мном пролазили овај трновит пут од самог почетка. Хвала вам за СВЕ! Цоки и Сањици хвала за све дуге и луде ноћи и још луђа јутра.*

*Највећу захвалност дугујем својој породици. Мојим родитељима, који су дали све од себе да будем оно што сада јесам. Хвала Вам што сте ту за мене увек и у сваком аспекту живота, на свој љубави и разумевању коју ми пружате, за све непроспаване ноћи, хвала што сте мој неисцрпан извор енергије! Брату Јанку и сестри Јовани који су увек били мој подстицај за боље и непресушан извор инспирације. Маши, Вукашину и Виктору који су ме научили да је љубав неизмерна. И наравно, мом деди, мојим стричевима, стринама, сестрама и браћи. Хвала што сте веровали у мене!*

**Милена Д. Вукић**

**СКРАЋЕНИЦЕ**

**ИЗВОД**

**SUMMARY**

**Списак Слика**

**Списак Схема**

**Списак Табела**

<b>1. ОПШТИ ДЕО .....</b>	<b>1</b>
1.1. Опште карактеристике фамилије Boraginaceae.....	2
1.2. Опште карактеристике рода <i>Onosma L.</i> .....	4
1.2.1. <i>Onosma visianii</i> Clem.....	5
1.2.2. Секундарни метаболити из биљних врста рода <i>Onosma L.</i> .....	7
1.3. Нафтохинони.....	10
1.4. Изохексенил нафтазарини, шиконин и алканин.....	14
1.4.1. Хемијске особине шиконина, алканина и њихових деривата.....	15
1.4.2. Биосинтеза шиконина.....	16
1.5. Биолошка активност шиконина и његових деривата.....	21
1.5.1. Антимикробна активност.....	21
1.5.2. Антитуморска активност.....	23
1.5.3. Анти-инфламаторни ефекат.....	29
1.5.4. Антиоксидативни ефекат.....	31
1.5.5. Токсичност.....	32
1.6. Циклодекстрини.....	33
1.6.1. Структура циклодекстрина.....	33
1.6.2. Примена циклодекстрина.....	34
1.6.3. Инклузиони комплекси са циклодекстринима.....	35

<b>2.</b>	<b>ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО .....</b>	<b>39</b>
3.1.	Растварачи и хемикалије.....	40
3.2.	Сакупљање и припрема биљног материјала.....	41
3.3.	Припрема растварача.....	41
3.4.	Добијање екстракта биљке <i>Onosma visianii</i> Clem.....	42
3.5.	Изоловање нафтохинона из екстракта биљке <i>Onosma visianii</i> .....	43
	3.5.1. Припрема колоне и прелиминарно фракционисање екстракта.....	44
	3.5.2. Припрема препаративних плоча.....	47
3.6.	Одређивање садржаја индивидуалних компоненти нафтохинона у екстрактима.....	51
	3.6.1. HPLC-PDA анализа екстракта.....	51
3.7.	Модификована метода за изоловање нафтохинонских деривата.....	53
3.8.	Добијање инклузионог комплекса (бинарног система) ацетилшиконина са $\beta$ -циклодекстрином.....	57
3.9.	Структурна карактеризација изолованих нафтохинона и инклузионог комплекса ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин.....	57
3.10.	Одређивање фазне растворљивости.....	59
3.11.	Тестови цитотоксичности.....	60
	3.11.1. Коришћене ћелијске линије.....	60
	3.11.2. Припрема ћелија за тестирање.....	60
	3.11.3. Трипсинизација и пасажирање ћелија.....	60
	3.11.4. Одређивање броја вијабилних ћелија.....	61
	3.11.5. МТТ тест за испитивање цитотоксичности.....	62
	3.11.5.1. Припрема радних раствора.....	62
	3.11.5.2. Третман ћелија.....	63
	3.11.6. Статистичка обрада резултата.....	64
	3.11.7. Клоногени тест.....	64
3.12.	Проточна цитометрија.....	65

3.12.1. Одређивање типа ћелијске смрти употребом Annexin V-FITC/7-AAD кита.....	65
3.12.2. Анализа ћелијског циклуса.....	66
3.12.3. Акридин-оранж/етијидијум-бромид (АО/ЕВ) тест флуоресцентне микроскопије.....	67
3.12.4. Одређивање укупног садржаја реактивних кисеоничних врста (ROS есеј).....	67
3.12.5. Детекција и квантификација кисело-везикуларних органела (AVOs).....	68
3.12.6. Анализа протеина апоптозе и аутофагије.....	69
3.13. Испитивање редокс статуса.....	69
3.13.1. Припрема радних раствора.....	69
3.13.2. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) NBT тестом.....	70
3.13.3. Одређивање концентрације нитрита ( $NO_2^-$ ).....	70
3.13.4. Одређивање концентрације редукованог (GSH) и оксидованог (GSSG) глутатиона.....	71
3.13.5. Статистичка обрада резултата.....	72
3.14. Испитивање интеракција нафтохинона <b>3</b> , <b>4</b> и <b>5</b> са молекулима од биолошког значаја.....	73
3.14.1. Припрема радних раствора.....	73
3.14.2. UV-Vis спектрофотометријска мерења.....	73
3.14.3. Флуориметријска мерења.....	74
3.14.4. Молекулски докинг.....	75
3.15. Испитивање антибактеријске активности.....	76
3.15.1. Коришћене бактерије.....	76
3.15.2. Припрема бактерија.....	76
3.15.3. Коришћени стандардни антибиотици.....	77
3.15.4. Микродилуциона метода.....	77
3.15.4.1. Припрема радних раствора.....	77
3.15.4.2. Третман бактерија.....	77
3.15.5. Статистичка обрада резултата.....	78

<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>79</b>
4.1.	Изоловање нафтохинонских деривата из корена (ризوما) биљке <i>O. visianii</i> Clem.....	80
4.2.	Структурна карактеризација изолованих нафтохинона <b>1-7</b> .....	82
4.2.1.	Деоксишиконин ( <b>1</b> ) .....	82
4.2.2.	Изобутирилшиконин ( <b>2</b> ).....	87
4.2.3.	$\alpha$ -Метилбутирилшиконин ( <b>3</b> ).....	92
4.2.4.	Ацетилшиконин ( <b>4</b> ).....	97
4.2.5.	$\beta$ -Хидроксиизовалерилшиконин ( <b>5</b> ).....	102
4.2.6.	5,8- <i>O</i> -Диметил изобутирилшиконин ( <b>6</b> ).....	106
4.2.7.	5,8- <i>O</i> -Диметил деоксишиконин ( <b>7</b> ).....	111
4.3.	Квантитативна анализа изолованих нафтохинона у различитим екстрактима биљке <i>O. visianii</i> Clem.....	116
4.4.	Цитотоксична активност екстракта корена биљке <i>O. visianii</i> Clem.....	123
4.5.	Утицај изабраних екстракта на апоптозу НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија.....	127
4.6.	Утицај изабраних екстракта на поделу ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија.....	129
4.7.	Цитотоксична активност изолованих нафтохинона <b>1-7</b> .....	132
4.8.	Ефекат изолованих нафтохинона на апоптозу НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија.....	135
4.9.	Ефекат изолованих нафтохинона на поделу ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија.....	137
4.10.	Ефекат нафтохинона <b>3, 4 и 5</b> на маркере оксидативног стреса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија.....	140
4.10.1.	Ефекат нафтохинона <b>3, 4 и 5</b> на продукцију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	140
4.10.2.	Ефекат нафтохинона <b>3, 4 и 5</b> на продукцију нитрита ( $NO_2^-$ ).....	143

4.10.3. Ефекат нафтохинона <b>3</b> , <b>4</b> и <b>5</b> на концентрацију редукованог (GSH) и оксидованог (GSSG) глутатиона.....	145
4.11. Интеракције нафтохинона <b>3</b> , <b>4</b> и <b>5</b> са биолошки важним молекулима.....	148
4.11.1. Интеракције нафтохинона <b>3</b> , <b>4</b> и <b>5</b> са молекулом ДНК.....	148
4.11.1.1. UV-Vis спектроскопска мерења.....	149
4.11.1.2. Флуоресцентна спектроскопска мерења.....	151
4.11.1.3. Молекулска докинг симулација.....	153
4.11.2. Интеракције нафтохинона <b>3</b> , <b>4</b> и <b>5</b> са молекулом HSA.....	155
4.11.2.1. UV-Vis спектроскопска мерења.....	155
4.11.2.2. Флуоресцентна спектроскопска мерења.....	156
4.11.2.3. Молекулска докинг симулација.....	159
4.12. Антибактеријска активност изолованих нафтохинона.....	160
4.13. Синтеза и структурна карактеризација инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD.....	164
4.13.1. UV-Vis спектрална анализа.....	164
4.13.2. FT-IC спектрална анализа.....	165
4.13.3. <sup>1</sup> H NMR спектрална анализа.....	168
4.13.4. XRPD структурна анализа.....	171
4.13.5. SEM карактеризација.....	172
4.13.6. Тест фазне растворљивости.....	173
4.14. Цитотоксична активност инклузионог комплекса ацетилшиконин/β-циклодекстрин ( <b>4</b> /β-CD) .....	174
4.14.1. МТТ тест.....	174
4.14.2. Клоногени тест.....	176
4.15. Ефекат инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD) на поделу ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија.....	178
4.16. Ефекат инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD) и слободног ацетилшиконина ( <b>4</b> ) на укупан садржај реактивних кисеоничних врста.....	179
4.17. Ефекат инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD на протеине апоптозе.....	180
4.18. Ефекат инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD на инхибицију аутофагије.....	182
<b>5. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>185</b>

**6. ЛИТЕРАТУРА ..... 191**

**БИОГРАФИЈА ..... 207**

**БИБЛИОГРАФИЈА**

**ПРИЛОГ**

**ПУБЛИКОВАНИ РАДОВИ**

## СКРАЋЕНИЦЕ

AVOs	<i>acido-vesicular organel</i> s; кисело-везикуларне органеле
АО	акридин-оранж
АПГ III	(2009) <i>Angiosperm Phylogeny Group</i> (група аутора која је 1998., 2003. и 2009. године обрадила дотадашња знања у области филогеније скривеносеменица и објавила их у виду класификационе шеме)
АПГ IV	(2016) <i>Angiosperm Phylogeny Group</i> (група аутора која је 1998., 2003., 2009. и 2016. године обрадила дотадашња знања у области филогеније скривеносеменица и објавила их у виду класификационе шеме)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
АТР	аденозин трифосфат
СТ-ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина изолована из тимуса телета
CoA	коензима А
CO <sub>2</sub>	угљен диоксид
DAPI	диамидино-2-фенилиндол
DCF	дихлорофлуоресцеин
DCFDA	дихлорофлуоресцеин диацетат
DMAPP	диметилалил дифосфат
DMSO	диметилсулфоксид
DMEM	Дулбеков модификовани игл медијум
DTNB	5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
ЕВ	етидијум-бромид
EDTA	етилендиамин тетрасирћетна киселина
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>
EPSP	3-фосфат-3-енолпирувилшिकимска киселина
IPP	изопентил дифосфат
IR	инфрацрвена спектроскопија
IC <sub>50</sub>	концентрација једињења која је неопходна за 50% инхибиције <i>in vitro</i>



<i>in vitro</i>	„у стаклу“, ван нормалног биолошког окружења
<i>in vivo</i>	„у живом“, унутар живог организма
KBr	калијум бромид
LOD	граница детекције
LOQ	граница квантификације
MIC	минимална инхибиторна концентрација
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид
NBT	нитро плаво тетразолијум
NADH	никотинамид аденин динуклеотид
NADPH	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	супероксид анјон радикал
OONO <sup>-</sup>	пероксинитрит
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (фосфатни пуфер)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (протеинска банка података)
PDA	фотодиодни детектор
PEP	фосфоенолпирувата
PI	пропидијум-јодид
PHB	4-хидрокси бензоеве киселина
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (реактивне врсте азота)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (реактивне врсте кисеоника)
Rf	ретенционо време
TBHP	терц-бутил-хидропероксид
TNB	5'-тио-2-нитробензоева киселина
UV-Vis	ултраљубичаста видљива спектроскопија
FBS	фетални говеђи серум
FT-IC	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом)
GSH	редуковани глутатион

GSSG	оксидовани глутатион
GPP	геранил фосфат
HPLC	<i>High performace liquid chromatography</i> (течна хроматографија високих перформанси)
HSA	хумани серум албумина
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	водоник пероксид
XRPD	<i>X-ray powder diffractometry</i> (рендгенска дифрактометрија праха)
β-CD	β-циклодекстрин
<sup>1</sup> HNMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
<sup>13</sup> CNMR	угљеник-13 нуклеарна магнетна резонаца
7-AAD	7-аминоактиномицин D
ε	молски коефицијент апсорптивности (dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
λ	таласна дужина
ν	таласни број
<i>J</i>	константа купловања
δ	хемијско померање

## ИЗВОД



Биљне врсте рода *Onosma* L се од давнина примењују као природне боје. Цвет неких врста се користе као поврће у исхрани док се њихов корен у традиционалној медицини користи за лечење рана, опекотина, отежаног дисања, промуклости, хемороида, болова у абдомену и чирева у желуцу. Ипак, када је реч о врсти *Onosma visianii* Clem до сада нису постојала научна сазнања о хемијском саству и фармаколошкој активност њеног корена.

Први задатак ове дисертације састојао се у изоловању биоактивних нафтохинонских деривата из корена биљке *O. visianii* Clem. Применом различитих хроматографских техника (стубне хроматографије-силика гел као адсорбенс, препаративне танкослојне хроматографије-силика гел као адсорбенс, хроматографије на колони Sephadex-LH20, препаративне течне хроматографије (HPLC)) оптимизована је ефикасна метода за изоловање нафтохинонских деривата из екстракта добијеног хладном мацерацијом применом растварачке смеше петрол етар:метилен хлорид (1:1 v/v). Овом методом изоловано је седам једињења и то деоксишиконин, изобутирилшиконин,  $\alpha$ -метилбутирилшиконин, ацетилшиконин,  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин, 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин (први пут идентификован у природном извору) и 5,8-*O*-диметил деоксишиконин. Њихова структурна карактеризација извршена је применом UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопских техника, као и употребом масене спектрометрије високе резолуције.

Следећи задатак састојао се у утврђивању најпогоднијег растварача за екстракцију биоактивних компонената корена биљке *O. visianii* Clem. Методом хладне мацерације добијено је пет екстраката (ацетонски, хлороформски, етил ацетатни, метанолни и петрол етарски). Употребом HPLC анализе утврђено је да екстракти хлороформа, ацетона и етил ацетата представљају боље раствараче за прелиминарну екстракцију биоактивних деривата нафтохинона изобутирилшиконина,  $\alpha$ -метилбутирилшиконина и ацетилшиконина, док је за екстракцију 5,8-*O*-диметил деривата пожељнија употреба ацетона или хлороформа. У наредном кораку испитана је и цитотоксична активност добијених екстраката на ћелијама канцера дебелог црева и дојке применом МТТ теста и метода за детекцију апоптозе и анализе ћелијског циклуса. Добијени резултати су показали значајно бољу активност екстраката ацетона, хлороформа и етил ацетата при чему је цитотоксични ефекат екстраката

у директној корелацији са количином индивидуалних компоненти нафтохинонских пигмената.

Испитана је и биолошка активност изолованих једињења, најпре употребом МТТ теста, као и методама за детекцију апоптозе и анализе ћелијског циклуса на ћелијама канцера дебелог црева и дојке. Нафтохинонски деривати  $\alpha$ -метилбутирилшиконин, ацетилшиконин и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин показали су најјачи цитотоксични ефекат па је даље испитан и њихов ефекат на маркере оксидативног стреса. Третман овим једињењима изазвао је поремећај оксидативне хомеостазе ћелија рака дебелог црева и дојке, повећавајући ниво супероксид анјон радикала, нитрита, оксидованог и редукованог глутатиона. У следећем кораку је испитана и могућност интеракција ова три нафтохинона са молекулима ДНК и HSA. Резултати добијени применом UV-Vis и FL спектроскопских техника као и молекулске докинг симулације јасно указују да се тестирана једињења везују у области малог жлеба молекула ДНК као и да имају могућност да се чврсто вежу за HSA, и сасвим безбедно транспортују до циљних ћелија. Такође, испитана је и антибактеријска активност свих изолованих нафтохинона. Добијени резултати су показали да изоловани нафтохинони показују добру антибактеријску активност како према грам позитивним, тако и према грам негативним бактеријским сојевима, при чему су  $\alpha$ -метилбутирилшиконин и ацетилшиконин показали најзначајнију активност.

Нафтохинони су по природи липофилна једињења на чију стабилност утиче и дејство кисеоника из ваздуха као и температура али и UV зрачење. У циљу повећања биорасположивости и фармацеутске ефикасности нафтохинона искоришћена је могућност њихове енкапсулације унутар хидрофобне шупљине молекула  $\beta$ -CD. Резултати добијени применом UV-Vis, IR и  $^1\text{H}$  NMR спектроскопије, као и рендгенске дифрактометрије праха (XPRD) и скенирајуће електронске микроскопије (SEM) потврдили су да је добијен бинарни систем ацетилшиконин/ $\beta$ -CD. Тест фазне растворљивости показао је да је добијен инклузиони систем AL-типа, као и да је однос субстрат/лиганд 1:1 М/М. Како би потврдили да ли је енкапсулацијом повећана биолошка активност повећањем биорасположивости енкапсулираног нафтохинона, испитано је цитотоксично дејство енкапсулираног и слободног ацетилшиконина на ћелијама канцера дебелог црева и дојке применом МТТ теста, клоногеног теста као и методама за детекцију апоптозе и анализе ћелијског циклуса. Такође, испитан је и њихов ефекат на продукцију интрацелуларних реактивних кисеоничних врста (ROS), као и на експресију кључних апоптотских протеина, и на инхибицију аутофагије. Добијени резултати су указали да формирање бинарног система значајно утиче на побољшање активности нафтохинонских деривата.

Резултати добијени приликом израде ове докторске дисертације представљају значајан допринос фармаколошком и фитохемијском опису биљке *Onosma visianii* Clem и указују на могућу примену изолованих нафтохинонских деривата у развоју нових антибактеријских формулација, као и у развоју нових стратегија у борби са раком дебелог црева и дојке.

## SUMMARY



Since ancient times, plant species of the genus *Onosma* L have been used as natural colorants. Flowers of some species are used as a vegetable in nutrition, while their roots are used in traditional medicine in the treatment of wounds, burns, shortness of breath, hoarseness, hemorrhoids, abdominal pain and gastric ulcers. Nevertheless, for the plant species of *Onosma visianii* Clem, so far there has been no scientific knowledge of its root chemical composition and pharmacological activity.

The first task of this dissertation was isolation of bioactive naphthoquinone derivatives from the roots of the plant *O. visianii* Clem. Using different chromatographic techniques (column chromatography-silica gel as adsorbent, preparative thin layer chromatography-silica gel as adsorbent, column chromatography Sephadex-LH20, preparative liquid chromatography (HPLC)), we optimized an efficient method for isolation of naphthoquinones from the extract obtained by cold maceration using a solvent mixture of petroleum ether:methylene chloride (1:1 v/v). Using this metode we isolated seven compounds: deoxyshikonin, isobutyrylshikonin,  $\alpha$ -methylbutyrylshikonin, acetylshikonin,  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin, 5,8-*O*-dimethyl isobutyrylshikonin (first time identified in a natural source) and 5,8-*O*-dimethyl deoxyshikonin. Their structural characterization was performed by UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic techniques, as well as using high resolution mass spectrometry.

The next task was to determine the most suitable solvent for the extraction of the bioactive components from the roots of the *O. visianii* Clem. Five extracts (acetone, chloroform, ethyl acetate, methanol and petroleum ether) were obtained using cold maceration method. Performed HPLC analysis showed that chloroform, acetone, and ethyl acetate are better solvents for the preliminary extraction of isobutyrylshikonin,  $\alpha$ -methylbutyrylshikonin and acetylshikonin, while the use of chloroform and acetone as solvents is preferable for extraction of 5,8-*O*-dimethyl derivatives. The cytotoxic activity of the obtained extracts was examined on colon and breast cancer cells using the MTT assay, methods for the detection of apoptosis and cell cycle analysis. Obtained results showed significantly better activity of acetone, chloroform and ethyl acetate extracts, suggesting that cytotoxic effect of the extracts are in direct correlation with the amount of individual components of the naphthoquinone pigments.

Next, we examined the biological activity of the seven isolated naphthoquinone compounds. Initially we studied their cytotoxic effects on colon and breast cancer cells using the MTT assay, methods for the detection of apoptosis as well as cell cycle analysis. The naphthoquinone derivatives  $\alpha$ -methylbutyrylshikonin, acetylshikonin and  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin showed the strongest cytotoxic activity so we additionally examined their effect on the oxidative stress markers. The results showed that treatment with these compounds caused a disruption of the oxidative homeostasis of colon and breast cancer cells, increasing the levels of superoxide anion radical, nitrite, oxidized and reduced glutathione. The following step was to examine the possibility of interactions of these three naphthoquinones with DNA and HSA molecules. The results using UV-Vis and FL spectroscopic techniques as well as molecular docking simulations clearly indicate that the tested compounds can bind in the region of the small groove of DNA molecule, and that can bind strongly to HSA and be transported safely to the target cells. Additionally, we studied antibacterial activity of seven isolated naphthoquinones. Obtained results showed that all isolated naphthoquinones exhibited potent antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacterial strains, with  $\alpha$ -methylbutyrylshikonin and acetylshikonin showing the most significant activity against all tested bacterial strains.

Naphthoquinone are known as lipophilic compounds whose stability is affected by the action of oxygen from the air as well as temperature and UV radiation. In order to increase bioavailability and pharmaceutical efficiency of naphthoquinones, the possibility of their encapsulation within the hydrophobic cavity of the  $\beta$ -CD molecule was exploited. The results of UV-Vis, IR and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, as well as X-ray powder diffractometry (XPRD) and scanning electron microscopy (SEM) showed that the acetylshikonin/ $\beta$ -CD binary system was obtained. The phase solubility test showed that the  $A_L$ -type inclusion system was obtained, and that the substrate/ligand ratio was 1:1 M/M. In order to confirm whether encapsulation increased biological activity, the cytotoxic effect of encapsulated and free acetylshikonin on colon and breast cancer cells was examined using MTT assay, clonogenic assay as well as apoptosis detection methods and cell cycle analysis. Also, the effect on the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) were examined, as well as their effect on expression of key apoptotic proteins, and the inhibition of autophagy. The obtained results indicate that the formation of a binary system significantly influences the enhancement of the activity of naphthoquinone derivatives.

The results obtained represent a significant contribution to the pharmacological and phytochemical description of the *Onosma visianii* Clem plant and indicate the possible use of isolated naphthoquinone derivatives in the development of new antibacterial formulations, as well as in the development of new strategies against colon and breast cancer.

## Списак Слика

<b>Слика 1.1.</b>	Илустровани приказ биљних врста фамилије Boraginaceae (преузето са <a href="https://www.c82.net">https://www.c82.net</a> ).....	2
<b>Слика 1.2.</b>	Биљне врсте фамилије Boraginaceae богате нафтохинонима (слике су преузете са <a href="https://www.paldat.org">https://www.paldat.org</a> и <a href="https://www.wikiwand.com">https://www.wikiwand.com</a> ).....	4
<b>Слика 1.3.</b>	<i>Onosma visianii</i> Clem (преузето са <a href="http://www.terra.hu">http://www.terra.hu</a> ) .....	6
<b>Слика 1.4.</b>	Структуре скелета бензохинона и њиховог деривата Коензима Q10.....	10
<b>Слика 1.5.</b>	Структуре скелета антрахинона (А) и фенантрахинона (Б).....	11
<b>Слика 1.6.</b>	Структуре скелета нафталена и нафтохинона.....	11
<b>Слика 1.7.</b>	Структуре хидроксил деривата нафтохинона изолованих из биљака....	13
<b>Слика 1.8.</b>	Структуре алканина и шиконина и изглед корена биљке из којег су изоловани.....	14
<b>Слика 1.9.</b>	Морфологија апоптичних ћелија. (А) Карактеристике апоптичних ћелија (1) изглед под мултимодалним холографским микроскопом; (2) симулирани DIC (диференцијални интерференцијски контраст) увећање од 20 пута изведено је помоћу МНМ; (3) Annexin V бојење за потврду промена у ћелијској мембрани. Апоптототске ћелије су приказане у почетном кораку (горе) где су ћелије обично округлог облика и у напредном (доле) кораку са стварањем апоптотских тела (Б) Илустровани приказ апоптотске ћелије. Преузето и модификовано из Balvan J. et al. 2015. <sup>90</sup> .....	26
<b>Слика 1.10.</b>	Структуре естара из групе алканина изолованих из биљке <i>Alkanna tintoria</i> и активни принципи масти Histoplastin red <sup>®</sup> .....	30
<b>Слика 1.11.</b>	Структуре циклодекстрина. Шематски приказ (А) β-D-глукопиранозних јединица, (Б) тродимензионалне структуре циклодекстрина и (Ц) хемијске структуре и димензије α-CD, β-CD и γ-CD. Преузето и модификовано из Crini G. et al. 2018 <sup>125</sup> .....	34
<b>Слика 3.1.</b>	Добијени екстракт корена биљке <i>O. visianii</i> Clem.....	42
<b>Слика 3.2.</b>	Екстракција хладном мацерацијом .....	43
<b>Слика 3.3.</b>	Прелиминарно фракционисање нафтохинона на колони силика гела....	45
<b>Слика 3.4.</b>	TLC хроматограм двадесетседам добијених фракција. Елуент растварачка смеша петрол етар:метилен хлорид (97:3).....	46
<b>Слика 3.5.</b>	TLC хроматограм двадесетседам добијених фракција. Елуент растварачка смеша петрол етар:метилен хлорид (95:5).....	46
<b>Слика 3.6.</b>	TLC хроматограм двадесетседам добијених фракција. Елуент растварачка смеша петрол етар:метилен хлорид (90:10).....	46
<b>Слика 3.7.</b>	Прелиминарно раздвајање фракција екстракта корена биљке <i>O. visianii</i> препаративном танкослојном хроматографијом.....	53
<b>Слика 3.8.</b>	Процес реекстракције и добијања чистих фракција.....	54
<b>Слика 3.9.</b>	Пречишћавање добијених фракција применом стубне хроматографије на колони пуњеној Sephadex LH20.....	55
<b>Слика 3.10.</b>	Аналитичка TLC плоча пречишћених једињења (А) смеша за елуирање фракција F3-F8 петрол етар:етил ацетат (90:10); (Б) смеша за	

	елуирање фракција <i>F1</i> и <i>F2</i> петрол етар:хлороформ:етил ацетат (40:20:40).....	56
<b>Слика 4.1.</b>	Структуре изолованих нафтохинона.....	81
<b>Слика 4.2.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми деоксишиконина ( <i>1</i> ).....	83
<b>Слика 4.3.</b>	UV-Vis спектар деоксишиконина ( <i>1</i> ).....	83
<b>Слика 4.4.</b>	IR спектар деоксишиконина ( <i>1</i> ).....	84
<b>Слика 4.5.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар деоксишиконина ( <i>1</i> ).....	85
<b>Слика 4.6.</b>	Структура деоксишиконина ( <i>1</i> ) са истакнутим магнетно и хемијски нееквивалентним, геминалним протонима на C-12 угљениковом атому	85
<b>Слика 4.7.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар деоксишиконина ( <i>1</i> ).....	86
<b>Слика 4.8.</b>	Масени спектар високе резолуције деоксишиконина ( <i>1</i> ) .....	87
<b>Слика 4.9.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми изобутирилшиконина ( <i>2</i> )....	88
<b>Слика 4.10.</b>	UV-Vis спектар изобутирилшиконина ( <i>2</i> ).....	88
<b>Слика 4.11.</b>	IR спектар изобутирилшиконина ( <i>2</i> ).....	89
<b>Слика 4.12.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар изобутирилшиконина ( <i>2</i> )(A) увећан део спектралне области од 1 до 1,9 ppm (B).....	90
<b>Слика 4.13.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар изобутирилшиконина ( <i>2</i> ).....	91
<b>Слика 4.14.</b>	Масени спектар високе резолуције изобутирилшиконина ( <i>2</i> ).....	92
<b>Слика 4.15.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми α-метилбутирилшиконина ( <i>3</i> ) .....	93
<b>Слика 4.16.</b>	UV-Vis спектар α-метилбутирилшиконина ( <i>3</i> ).....	93
<b>Слика 4.17.</b>	IR спектар α-метилбутирилшиконина ( <i>3</i> ).....	94
<b>Слика 4.18.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар α-метилбутирилшиконина ( <i>3</i> ) (A) увећан део спектралне области од 0,8 до 1,2 ppm (B).....	95
<b>Слика 4.19.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар α-метилбутирилшиконина ( <i>3</i> ).....	96
<b>Слика 4.20.</b>	Масени спектар високе резолуције α-метилбутирилшиконина ( <i>3</i> ).....	97
<b>Слика 4.21.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми ацетилшиконина ( <i>4</i> ).....	98
<b>Слика 4.22.</b>	UV-Vis спектар ацетилшиконина ( <i>4</i> ).....	98
<b>Слика 4.23.</b>	IR спектар ацетилшиконина ( <i>4</i> ).....	99
<b>Слика 4.24.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар ацетилшиконина ( <i>4</i> ).....	100
<b>Слика 4.25.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар ацетилшиконина ( <i>4</i> ).....	101
<b>Слика 4.26.</b>	Масени спектар високе резолуције ацетилшиконина ( <i>4</i> ).....	101
<b>Слика 4.27.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми β-хидроксиизовалерилшиконина ( <i>5</i> ) .....	102
<b>Слика 4.28.</b>	UV-Vis спектар β-хидроксиизовалерилшиконина ( <i>5</i> ).....	103
<b>Слика 4.29.</b>	IR спектар β-хидроксиизовалерилшиконина ( <i>5</i> ).....	103
<b>Слика 4.30.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар β-хидроксиизовалерилшиконина ( <i>5</i> ) .....	104
<b>Слика 4.31.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар β-хидроксиизовалерилшиконина ( <i>5</i> ) .....	105
<b>Слика 4.32.</b>	Масени спектар високе резолуције β-хидроксиизовалерилшиконина ( <i>5</i> ).....	106
<b>Слика 4.33.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконина ( <i>6</i> ).....	107
<b>Слика 4.34.</b>	UV-Vis спектар 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконина ( <i>6</i> ).....	107
<b>Слика 4.35.</b>	IR спектар 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконина ( <i>6</i> ).....	108
<b>Слика 4.36.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконина ( <i>6</i> ).....	109
<b>Слика 4.37.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконина ( <i>6</i> ).....	110



<b>Слика 4.38.</b>	Масени спектар високе резолуције 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконина (6).....	111
<b>Слика 4.39.</b>	TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконина (7).....	112
<b>Слика 4.40.</b>	UV-Vis спектар 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконина (7).....	112
<b>Слика 4.41.</b>	IR спектар 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконина (7).....	113
<b>Слика 4.42.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектар 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконина (7).....	114
<b>Слика 4.43.</b>	<sup>13</sup> C NMR спектар 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконина (7).....	115
<b>Слика 4.44.</b>	Масени спектар високе резолуције 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконина (7)	116
<b>Слика 4.45.</b>	HPLC-PDA хроматограми екстракта (ацетона и хлороформа) на $\lambda=520$ nm (А) и $\lambda=460$ nm (Б). Идентификација пикова: деоксишиконин (1), изобутирилшиконин (2), $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4), $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5), 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирил шиконин (6) и 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконин (7).....	119
<b>Слика 4.46.</b>	HPLC-PDA хроматограми екстракта (етил ацетата и метанола) на $\lambda=520$ nm (А) и $\lambda=460$ nm (Б). Идентификација пикова: деоксишиконин (1), изобутирилшиконин (2), $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4), $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5), 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирил шиконин (6) и 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконин (7).....	120
<b>Слика 4.47.</b>	HPLC-PDA хроматограми екстракта петрол етара на $\lambda=520$ nm (А) и $\lambda=460$ nm (Б). Идентификација пикова: деоксишиконин (1), изобутирилшиконин (2), $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4), $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5), 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирил шиконин (6) и 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконин (7).....	121
<b>Слика 4.48.</b>	Дозно-зависне криве ефеката различитих екстракта (ац-ацетонски екстракт, хло-хлороформски екстракт, ет-етил ацетатни екстракт, мет-метанолни екстракт, пет-петрол етарски екстракт) корена биљке <i>O. visianii</i> Clem на НСТ-116 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења.....	124
<b>Слика 4.49.</b>	Дозно-зависне криве ефеката различитих екстракта (ац-ацетонски екстракт, хло-хлороформски екстракт, ет-етил ацетатни екстракт, мет-метанолни екстракт, пет-петрол етарски екстракт) корена биљке <i>O. visianii</i> Clem на MDA-MB-231 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења.....	125
<b>Слика 4.50.</b>	Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом употребом Annexin V-FITC/7-AAD бојења. (А) Представљена је дистрибуција ћелија по квадрантима и то вијабилних (доњи леви квадрант), некротичних (горњи леви квадрант), апоптичних (доњи десни квадрант) и касно апоптичних (горњи десни квадрант) НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних ацетонским (АЦ), хлороформским (ХЛО) и етил ацетатним (ЕТ)	

	екстрактом. (Б) Дијаграми који представљају проценат рано апоптичних (РА), касно апоптичних (КА) и некротичних (Н) НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних ацетонским, хлороформским и етил ацетатним екстрактом. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења.....	128
<b>Слика 4.51.</b>	Промене у ћелијској морфологији мерене АО/ЕВ флуоресцентним бојењем. Промене су посматране под флуоресцентним микроскопом (увеличање 400х). Живе ћелије имају зелена једра са дефинисаном структуром, рано апоптотске ћелије имају светло зелено док касно апоптотске имају наранџасто-црвено једро кондензованог или фрагментисаног хроматина. ....	129
<b>Слика 4.52.</b>	Анализа дистрибуције ћелијског циклуса проточном цитометријом. (А) Хистограми су репрезентативни за три независна експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија ацетонским (АЦ), хлороформским (ХЛО) и етил ацетатним (ЕТ) екстрактом. (Б) Дијаграми који представљају проценат застоја ћелијског циклуса у G0/G1, S или G2/M фазама код нетретираних ћелија (контрола) и третираних НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија ацетонским (АЦ), хлороформским (ХЛО) и етил ацетатним (ЕТ) екстрактом. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења.....	130
<b>Слика 4.53.</b>	Дозно-зависне криве ефеката изолованих једињења <i>I-7</i> на НСТ-116 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења.....	133
<b>Слика 4.54.</b>	Дозно-зависне криве ефеката изолованих једињења <i>I-7</i> на MDA-MB-231 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења.....	134
<b>Слика 4.55.</b>	Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом употребом Annexin V-FITC/7-AAD бојења. (А) Представљена је дистрибуција ћелија по квадрантима и то вијабилних (доњи леви квадрант), некротичних (горњи леви квадрант), апоптичних (доњи десни квадрант) и касно апоптичних (горњи десни квадрант) НСТ-116 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима <i>I-7</i> . (Б) Дијаграми који представљају проценат рано апоптичних (РА), касно апоптичних (КА) и некротичних (Н) НСТ-116 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима <i>I-7</i> . Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD добијене из три независна мерења. ....	135
<b>Слика 4.56.</b>	Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом употребом Annexin V-FITC/7-AAD бојења. (А) Представљена је дистрибуција ћелија по квадрантима и то вијабилних (доњи леви квадрант), некротичних (горњи леви квадрант), апоптичних (доњи десни	

- квадрант) и касно апоптичних (горњи десни квадрант) MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима *I-7*. (Б) Дијаграми који представљају проценат рано апоптичних (РА), касно апоптичних (КА) и некротичних (Н) MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима *I-7*. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења..... 136
- Слика 4.57.** Анализа дистрибуције ћелијског циклуса проточном цитометријом. (А) Хистограми су репрезентативни за три независна експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних НСТ-116 ћелија изолованим једињењима *I-7*. (Б) Дијаграми који представљају проценат застоја ћелијског циклуса у G0/G1, S или G2/M фази код нетретираних ћелија (контрола) и третираних НСТ-116 ћелија изолованим једињењима *I-7*. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења..... 137
- Слика 4.58.** Анализа дистрибуције ћелијског циклуса проточном цитометријом. (А) Хистограми су репрезентативни за три независна експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних MDA-MB-231 ћелија изолованим једињењима *I-7*. (Б) Дијаграми који представљају проценат застоја ћелијског циклуса у G0/G1, S или G2/M фази код нетретираних ћелија (контрола) и третираних MDA-MB-231 ћелија изолованим једињењима *I-7*. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења..... 138
- Слика 4.59.** Ефекти нафтохинона *3*, *4* и *5* у концентрацијама од 0,1 до 100  $\mu\text{g/mL}$  на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијске линије изражени као  $\text{nmol O}_2^{\cdot-}/\text{mL}$  након 24 h, 48 h и 72 h од третмана. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из три независна мерења..... 141
- Слика 4.60.** Ефекти нафтохинона *3*, *4* и *5* у концентрацијама од 0,1 до 100  $\mu\text{g/mL}$  на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијске линије изражени као  $\text{nmol NO}_2^{\cdot-}/\text{mL}$  након 24 h, 48 h и 72 h од третмана. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из три независна мерења..... 144
- Слика 4.61.** Ефекти различитих концентрација нафтохинона *3*, *4* и *5* на концентрацију редукованог глутатиона код НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија након третмана од 24 h, 48 h и 72 h. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из три независна мерења..... 146
- Слика 4.62.** Ефекти различитих концентрација нафтохинона *3*, *4* и *5* на концентрацију оксидованог глутатиона код НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија након третмана од 24 h, 48 h и 72 h. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из три независна мерења..... 147
- Слика 4.63.** (А) Апсорпциони спектар  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (*3*), ацетилшиконина (*4*) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (*5*) (концентрација сваког  $8,00 \times 10^{-5}$  M) пре (љубичаста испрекидана линија) и након додатка раствора СТ-ДНК увећаних концентрација ( $0 - 1,73 \times 10^{-4}$  M). Стрелица показује промену апсорбанце након

	додавања увећаних концентрација СТ-ДНК. (Б) Апсорпциони спектар СТ-ДНК ( $1,77 \times 10^{-5}$ М) пре (љубичаста испрекидана линија) и након додатка $\alpha$ -метилбутирилшिकонина (3), ацетилшिकонина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5) ( $0 - 1,80 \times 10^{-5}$ М). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5).....	150
<b>Слика 4.64.</b>	Емисиони спектар ЕВ-ДНК комплекса (ЕВ ( $1,2 \times 10^{-5}$ М) и ДНК ( $1,72 \times 10^{-5}$ М)), у одсуству (љубичаста испрекидана линија) и присуству увећаних концентрација $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5) (0 до $2,4 \times 10^{-5}$ М). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5) .....	152
<b>Слика 4.65.</b>	Емисиони спектар Ноеchst-ДНК (Ноеchst ( $1,2 \times 10^{-5}$ М) и ДНК ( $1,66 \times 10^{-5}$ М)), у одсуству (плава линија) и присуству увећаних концентрација $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5) (0 до $2,4 \times 10^{-5}$ М). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5). Десно: одговарајући Стерн-Волмерови дијаграми.....	153
<b>Слика 4.66.</b>	Интеракције између нафтохинона 3, 4 и 5 и молекула ДНК. Конвенционалне водоничне везе представљене су зеленим а хидрофобне интеракције љубичастим испрекиданим линијама.....	154
<b>Слика 4.67.</b>	Апсорпциони спектар HSA ( $2,00 \times 10^{-6}$ М) пре (љубичаста испрекидана линија) и након додавања увећаних концентрација раствора $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5) ( $0 - 1,60 \times 10^{-5}$ М). Стрелица указује на промену апсорпције након додавања увећаних концентрација раствора 3, 4 и 5.....	156
<b>Слика 4.68.</b>	(А) Флуоресцентни емисиони спектар протеина HSA ( $2,00 \times 10^{-6}$ М), пре (плава линија) и након додавања увећаних концентрација раствора $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3), ацетилшиконина (4) и $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5) (од 0 до $1,6 \times 10^{-5}$ М) (Б) Одговарајући Стерн-Волмерови дијаграми.....	157
<b>Слика 4.69.</b>	Интеракције између нафтохинона 3, 4 и 5 и аминокиселина протеина HSA. Конвенционалне водоничне везе обележене су зеленим испрекиданим линијама.....	159
<b>Слика 4.70.</b>	Апсорпциони спектри слободног ацетилшиконина (4), $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (4/ $\beta$ -CD).....	165
<b>Слика 4.71.</b>	FT-IR спектри слободног ацетилшиконина (4), $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (4/ $\beta$ -CD).....	166

<b>Слика 4.72.</b>	<sup>1</sup> H NMR спектри слободног ацетилшиконина ( <b>4</b> ), β-циклодекстрина (β-CD) и ацетилшиконин/β-циклодекстрин инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD).....	169
<b>Слика 4.73.</b>	Претподстављени начин инклузије ацетилшиконина ( <b>4</b> ) у шупљину β-циклодекстрина (β-CD) .....	170
<b>Слика 4.74.</b>	Карактеристике XRPD спектра ацетилшиконина ( <b>4</b> ), β-циклодекстрина (β-CD) и ацетилшиконин/β-циклодекстрин инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD).....	171
<b>Слика 4.75.</b>	SEM слике инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD) увећане 1000 (А), 2500 (Б), 5000 (Ц) и 7500 (Д) пута.....	172
<b>Слика 4.76.</b>	Дијаграм фазне растворљивости ацетилшиконина ( <b>4</b> ) са β-циклодекстрином у дестилованој води на 25 °C. Вредности су приказане као средње вредности ± SD од три различита експеримента.....	173
<b>Слика 4.77.</b>	Дозно зависне криве цитотоксичног ефекта различитих концентрација <b>4</b> , <b>4</b> /β-CD и β-CD на НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијама након третмана од 24 h, 48 h и 72 h, одређене МТТ тестом. Добијени резултати представљени су као средња вредност од три независна мерења ± SD.....	175
<b>Слика 4.78.</b>	Клоногено преживљавање НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија третираних различитим концентрацијама ацетилшиконина ( <b>4</b> ) и инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD). Графици фактора преживљавања НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија третираних једињењем <b>4</b> и инклузионим комплексом <b>4</b> /β-CD. Резултати су представљени као средње вредности ± SD из три независна експеримента.....	176
<b>Слика 4.79.</b>	Клоногено преживљавање НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија третираних различитим концентрацијама ацетилшиконина ( <b>4</b> ) и инклузионог комплекса ( <b>4</b> /β-CD). Слике клоногеног теста.....	177
<b>Слика 4.80.</b>	Ефекат једињења <b>4</b> и инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD на дистробицију ћелијског циклуса НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија. Дијаграми представљају проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. Резултати су представљени као средње вредности ± SD добијене из три независна мерења.....	178
<b>Слика 4.81.</b>	Ефекат слободног ацетилшиконина ( <b>4</b> ) и инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD на продукцију реактивних кисеоничних врста у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама. Резултати су представљени као средње вредности ± SD добијене из три независна мерења.....	180
<b>Слика 4.82.</b>	Експресија регулаторних протеина апоптозе у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијама третираним IC <sub>50</sub> вредностима слободног ацетилшиконина ( <b>4</b> ) и инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD у временском интервалу од 48 h. Однос нивоа Bcl-2/Bax протеина у третираним и контролним ћелијама. Резултати су представљени као средње вредности ± SD од три независна експеримента.....	181
<b>Слика 4.83.</b>	Експресија регулаторних протеина апоптозе у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијама третираним IC <sub>50</sub> вредностима слободног ацетилшиконина ( <b>4</b> ) и инклузионог комплекса <b>4</b> /β-CD у временском интервалу од 48 h. Процент третираних и нетретираних ћелија које	

	експримирају активну каспазу-3. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD од три независна експеримента.....	181
<b>Слика 4.84.</b>	Ефекти ацетилшиконина ( <b>4</b> ) и инклузионог комплекса ( <b>4</b> / $\beta$ -CD) на инхибицију аутофагије у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама. Процент црвених/зелених ћелија у <b>4</b> и <b>4</b> / $\beta$ -CD третираним НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама у поређењу са контролом. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD од три независна експеримента.....	183
<b>Слика 4.85.</b>	Експресија p62 протеина у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама третираним слободним ацетилшиконином ( <b>4</b> ) и инклузионим комплексом ( <b>4</b> / $\beta$ -CD) у поређењу са контролом. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD од три независна експеримента.....	183

## Списак Схема

<i>Схема 1.1.</i>	Редокс особине нафтохинона.....	12
<i>Схема 1.2.</i>	Механизам фотооксидације шиконина.....	16
<i>Схема 1.3.</i>	Биосинтеза геранил дифосфата.....	17
<i>Схема 1.4.</i>	Биосинтеза L-фенилаланина из шикимске киселине.....	18
<i>Схема 1.5.</i>	Биосинтеза 4-хидроксибензоеве киселине од L-фенилаланина.....	19
<i>Схема 1.6.</i>	Биосинтеза шиконина из 4-хидроксибензоеве киселине и геранил фосфата.....	20
<i>Схема 1.7.</i>	Биоредуктивно алкиловање; Nu-нуклеофил.....	28

**Списак Табела**

<b>Табела 1.1.</b>	Таксономске категорије и таксони рода <i>Onosma</i> .....	5
<b>Табела 1.2.</b>	Деривати нафтохинона идентификовани у биљкама рода <i>Onosma</i> .....	8
<b>Табела 1.3.</b>	Механизми индукције апоптозе шиконином у ћелијским линијама канцера <i>in vitro</i> .....	24
<b>Табела 3.1.</b>	Растварачи коришћени за елуирање препаративних плоча у зависности од фракције.....	47
<b>Табела 3.2.</b>	HPLC програм мобилне фазе за елуирање.....	51
<b>Табела 4.1.</b>	Једначине калибрационих кривих за нафтохиноне. Коефицијент корелације калибрационих кривих, граница детекције и квантификације и опсег линераности.....	117
<b>Табела 4.2.</b>	Површине пикова испитиваних нафтохинона представљене као средње вредности $\pm$ SD од 3 мерења.....	118
<b>Табела 4.3.</b>	Концентрације нафтохинона у различитим екстрактима корена биљке <i>O. visianii</i> . Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ SD од три независна експеримента.....	122
<b>Табела 4.4.</b>	Цитотоксична активност различитих екстраката корена биљке <i>O. visianii</i> Clem и стандардне цисплатине на две ћелијске линије (HCT-116 и MDA-MB-231) изражена преко IC <sub>50</sub> вредности ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	123
<b>Табела 4.5.</b>	Цитотоксична активност изолованих нафтохинона <i>1-7</i> на две ћелијске линије (HCT-116 и MDA-MB-231) изражена преко IC <sub>50</sub> вредности ( $\mu\text{g/mL}$ ) 24 h, 48 h и 72 h након третмана.....	132
<b>Табела 4.6.</b>	Константе гашења флуоресценције, константе везивања и број везивних места код интеракција нафтохинона <i>3, 4</i> и <i>5</i> са хуманим серум албумином (HSA).....	158
<b>Табела 4.7.</b>	Антибактеријска активност изолованих нафтохинона <i>1-7</i> (MIC <sub>50</sub> ).....	160
<b>Табела 4.8.</b>	Антибактеријска активност изолованих нафтохинона <i>1-7</i> (MIC <sub>90</sub> ).....	161
<b>Табела 4.9.</b>	Резистентност тестираних бактерија на одређене антибиотике.....	163
<b>Табела 4.10.</b>	Хемијска померања ( $\delta/\text{ppm}$ , DMSO-d <sub>6</sub> ) протона у спектрима слободног <i>4</i> , слободног $\beta$ -CD и бинарног система <i>4</i> / $\beta$ -CD.....	168
<b>Табела 4.11.</b>	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) вредности слободног ацетилшиконина ( <i>4</i> ) и инклузионог комплекса ( <i>4</i> / $\beta$ -CD) на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама након третмана од 24 h, 48 h и 72 h, одређене МТТ тестом.....	174





*1. Ονυμυ δεο*

## 1.1. Опште карактеристике фамилије Boraginaceae

Фамилија Boraginaceae (срп. Поречнице) је распрострањена у тропским и субтропским крајевима, а састоји се од око 100 родова и 2000 врста. Претежно ову фамилију чине дрвеће, шибље или зељасте биљке, а ређе и лијане<sup>1-4</sup>. Биљне врсте ове фамилије су годишње до вишегодишње. На *Слика 1.1.* представљен је илустрован приказ биљне врсте фамилије Boraginaceae.



*Слика 1.1.* Илустровани приказ биљних врста фамилије Boraginaceae (преузето са <https://www.c82.net>)

Према ботаничким подацима цветови ове фамилије су актиноморфни, осим код родова *Echium* и *Lycopsis*. Чашница им је слободна или постфлорално разрасла, круница је срасла, левкста, тањирастог или звонастог облика. Тучак им је синкарпан, грађен од два оплодна листића. Плодник је надаветан, двоок, при чему се у сваком оку налазе по два анатропна семена заметка. Због секундарне преграде плодник може бити и четвороок са по једним семеним заметком у сваком оку. Плод им је коштуница или орашчић, или четири орашчића одвојена преградама<sup>1,5,6</sup>.

Класификација ове фамилије се драстично мењала временом, посебно од тренутка када су молекуларни подаци и филогенетске анализе постале доступне. Традиционално, фамилија *Boraginaceae* је подељена у пет подфамилија - *Boraginoideae*, *Heliotropioideae*, *Cordioideae*, *Wellstedioideae* и *Ehretioideae*<sup>1,5,7</sup>. Међутим и данас постоје проблеми са коначном класификацијом подфамилија, које многе истраживачке групе годинама уназад покушавају да реше. Новија истраживања довела су до идентификације од четири до седам подфамилија (*Boragineae*, *Cynoglosseae*, *Echiochileae*, *Lithospermeae*, проширене са *Trichodesmeae*, *Myosotidae* и *Trigonotideae*), и ова класификација фамилије *Boraginaceae* је тренутно широко прихваћена, а као и традиционална подела заснива се на морфолошким карактеристикама цвета и плода<sup>8</sup>. Ова подела се међутим не слаже са званичном APG III (2009) (*Angiosperm Phylogeny Group*) класификацијом, која ову фамилију третира у ширем смислу, при чему је неколико таксона препознато на нивоу фамилије<sup>8,9</sup>.

По најновијој APG IV (2016) класификацији *Boraginaceae* је препозната као јединствена фамилија у оквиру реда *Boraginales*, који се састоји од: *Boraginaceae sensu stricto*, *Codonaceae*, *Coldeniaceae*, *Cordiaceae*, *Ehretiaceae*, *Heliotropiaceae*, *Hoplostigmataceae*, *Hydrophyllaceae*, *Lennoaceae*, *Namaceae* и *Wellstediaceae*<sup>10</sup>.

Фитохемијска истраживања ове фамилије показала су да су најзаступљенији секундарни метаболити из класа флавоноида, терпена, фруктана, алантона, нафтохинона и пиролизидинских алкалоида<sup>7,11-13</sup>. Многе биљке које припадају овој фамилији имају значајну терапеутску и козметичку примену<sup>11</sup>. У исхрани се слабо користе због присуства токсичних пиролизидинских алкалоида у надземном делу биљке. Црвени корен биљака ове фамилије се употребљава као боја за козметичке препарате, текстил и кожу. Семе ових биљака је јако богато уљима која се састоје од незасићених масних киселина, токоферола и мале количине пиролизидинских алкалоида<sup>7</sup>.

У оквиру фамилије *Boraginaceae* врсте које садрже нафтохиноне припадају родовима *Alkanna*, *Cordia*, *Lithospermum*, *Arnebia* и *Onosma* (Слика 1.2.)<sup>4</sup>. Најзначајнији нафтохинони који се налазе у овим биљним врстама су из групе шиконина и алканина. У тропским и суптропским областима најзаступљенији је род *Cordia*, који се може наћи у око 250 различитих врста. *Lithospermum* има око 40 врста у умереној зони целе северне хемисфере, али је најчешћи на медитерану, док је род *Onosma* заступљен у свим областима медитерана.





Слика 1.2. Биљне врсте фамилије *Boraginaceae* богате нафтохинонима (слике су преузете са <https://www.paldat.org> и <https://www.wikiwand.com>)

## 1.2. Опште карактеристике рода *Onosma* L

Име *Onosma* потиче од латинске речи „осма“ што представља мирис, а у ботаничку номенклатуру ово име увео је Линеус (Linnaeus) <sup>14</sup>. За сада је познато око 200 врста овог рода распоређених претежно у медитеранском региону и Централној Азији <sup>15-18</sup>. Све врсте расту на сувим и осунчаним стаништима, а претежно их чине двогодишње и вишегодишње биљке <sup>14,16,19</sup>. Таксономске категорије овог рода сумиране су у *Табела 1.1.*

Врсте овог рода имају примену у традиционалној медицини, као природне боје, а цветови неких врста се користе и као поврће у исхрани <sup>20</sup>. Њихов корен се у традиционалној медицини користи у лечењу рана, опекотина, отежаног дисања, промуклости, хемороида, болова у абдомену и чирева у желуцу (*Onosma sericeum* Willd., *Onosma microcarpum* DC., *Onosma argentata* Hub.-Mor. и *Onosma armeniaca* Klokov) <sup>5,21-25</sup>.

Табела 1.1. Таксономске категорије и таксони рода *Onosma*

Таксономске категорије	Таксони
Царство	Plantae
Одељак	Magnoliophyta
Разред (Class)	Magnoliopsida
Подкласа (Subclass)	Asteridae
Ред (Order)	Boraginales
Фамилија (Family)	Boraginaceae
Подфамилија (tribe)	Lithospermeae
Род	<i>Onosma</i> L

Досадашња фитохемијска истраживања су показала да ове биљке садрже нафтохиноне, алкалоиде и фенолна једињења<sup>14,16</sup>. Нафтохинони су најзаступљенији у корену биљака овог рода, а поседују широк спектар биолошких активности као што су: зацеливање рана, антиуапална, антитуморска, антимикуробна и анти тромботичка својства<sup>22</sup>. Управо због ових значајних фармаколошких активности ова група секундарних метаболита привукла је велику пажњу истраживача. У индустрији се користе као пигменти у козметичким препаратима и као адитиви у храни<sup>4</sup>. Са друге стране, литературни подаци говоре да надземни делови ове биљке садрже пиролизидинске алкалоиде и фенолне компоненте<sup>14,26</sup>.

### 1.2.1. *Onosma visianii* Clem

У документима Јована Владимира (990-1016. године), владара Дукље, *Onosma visianii* Clem се описује као такозвани црвени корен са планине Румије (трава од Румије или чудотворни корен). *Onosma visianii* Clem (Слика 1.3.) је ендем јужног Јадрана. Расте на обронцима Румије у ареалу од само неколико километара. Локална популација је ризом ове биљке вековима уназад препознала као лековит, и у том смислу се осим у сврху лечења домаћих животиња, користи у етномедицини за третман жутице, као и санирања и

зарастања рана. Потапањем корена у маслиново уље долази до растварања активних принципа класе нафтохинона који боје мацерат у тамно-црвену до љубичасту боју.



Слика 1.3. *Onosma visianii* Clem (слика преузета са <http://www.terra.hu>)

Са тачке гледишта хемијског састава, *Onosma visianii* је мало испитана. Осим што се зна да садржи шиконин, други литературни подаци везани за хемијски састав и фармаколошку активност ове биљке до сада нису постојали <sup>27</sup>.

Ботанички подаци говоре да је *Onosma visianii* Clem двогодишња биљка без нецветајућих изданака, док јој је корен дебело-цилиндричан и са црикастом кором. Стабло ове биљке високо је од 20 до 50 cm и на основи је опкољено тврдим прошлогодишњим листовима. Често је црвенкасто или љубичасто, а гране се завршавају увојцима. Цела биљка је прекривена густим и дугим чекињама, вертикално одстојећим, светлим, седећим длакама па потпуно голим малим чворићима. У неким случајевима чекиње могу да изостану између дугих чекињастих длака, где се налазе fine чекињице без чворића. Листови на основи и доњем делу стабла су дуги до 14 cm а широки око 0,8 cm и линеарно су ланцетасти. Листови на горњем делу стабла су основе широке 1-2 cm, а при врху се сужавју, облик им је јајасто ланцетасти, сви су крути и светло-зелене су боје. Чашице ове биљке су са кратким чекињастим длакама чији су крајци линеарно ланцетасти, поступно ушиљени. Круница им

је дуга од 12 до 16 mm (ретко до 24 mm), а споља је или гола или са длакама, бледожуте боје. Антере су 5 до 7 mm дуге, а на ободу су назубљене, а могу бити или исте дужине, или нешто дуже од филамента. На цвету, чашице су дуге од 15 до 17 mm и са кратком дршком. Семенке су им дуге од 3 до 4 mm и ушиљене, глатке и сјајне, сивомрке са тамним мрљама. Ова биљка поред делова Балканског полуострва насељава и крајеве Југоисточне Европе <sup>28</sup>.

### 1.2.2. Секундарни метаболити из биљних врста рода *Onosma* L

Биљке имају способност да синтетишу велики број природних производа који имају улогу у њиховом расту, развоју, репродукцији и дисању, а класификују се као *примарни метаболити*. У ову групу спадају неки главни молекули живота попут угљоводоника, протеина, масти и нуклеинских киселина <sup>29,30</sup>. Поред њих, у биљкама се врши и синтеза разноврсних молекула, такозваних *секундарних метаболита*. Секундарни метаболити представљају индивидуалност врсте, а у биљкама имају одбрамбене улоге као агенси против хербивора и фитопатогена, али и УВ зрачења. Ова једињења служе као алелопатски агенси, али и као атрактанти за корисне организме, учествују у процесу фиксирања азота у кореновом систему биљака, и имају улогу ендогених регулатора хормона раста <sup>29,31</sup>. Данас је познато да ова група природних производа има и велику улогу у адаптацији биљне врсте на различите еколошке фаткоре, па се стога сматра да су секундарни метаболити настали баш у том процесу. Литературни подаци описују секундарне метаболите као антибиотике, антифунгалне и антивиралне агенсе, што објашњава и њихову велику улогу у традиционалној медицини. Данас, ова једињења се користе и као дијететски суплементи у исхрани, али и као потенцијални извори природних лекова. Поред тога, употребљавају се као боје, влакна, лепкови, уља, воскови, као адитиви храни, као парфеми, хербициди, инсектициди и антибиотици <sup>30,32</sup>. Генерално, секундарни метаболити се могу поделити на основу њиховог биосинтетичког пута на феноле, терпене и стероиде, односно алкалоиде <sup>29,30</sup>.

На основу литературних података, биљке рода *Onosma* одликује велика количина нафтохинона претежно нађених у корену биљке, односно алкалоида и фенолних једињења у надземном делу. У Табела 1.2. представљени су нафтохинонски деривати идентификовани у биљкама рода *Onosma*. У овој докторској дисертацији говориће се о нафтохинонима из

групе шиконина (изохескенил нафтазарина) као главним секундарним метаболитима корена (ризوما) биљне врсте *Onosma visianii* Clem.

**Табела 1.2.** Деривати нафтохинона идентификовани у биљкама рода *Onosma*

Једињење	Биљна врста	Делови биљке	Реф.
Онозмин А	<i>O. hispidum</i>	цела биљка	33
Онозмин В	<i>O. hispidum</i>	цела биљка	33
Онозмон	<i>O. limitaneum</i>	лист	34
Хиспидон	<i>O. hispidum</i>	цела биљка	35
Алканин	<i>O. echioides</i>	корен	36
	<i>O. sericeum</i> Willd., <i>O. microcarpum</i>	корен	37
Ацетилалканин	<i>O. arenaria</i>	корен	38
	<i>O. graeca</i>	корен	39
Изовалерилалканин	<i>O. heterophylla</i>	корен	37
Изобутирилалканин	<i>O. kaheirei</i>	корен	39
	<i>O. graeca</i>	корен	39
β,β-Диметилакрилалканин	<i>O. dichroantha</i>	корен	40
	<i>O. heterophylla</i>	корен	37
	<i>O. graeca</i>	корен	39
β-Хидроксиизовалерилалканин	<i>O. arenaria</i>	корен	38
	<i>O. graeca</i>	корен	39
Деоксиалканин	<i>O. heterophylla</i>	корен	37
	<i>O. graeca</i>	корен	39
α-Метилбутирилалканин	<i>O. graeca</i>	корен	39
	<i>O. dichroantha</i>	корен	40
Шиконин	<i>O. sericeum</i> Willd., <i>O. microcarpum</i>	корен	37
	<i>O. visianii</i>	корен	27
	<i>O. waltonii</i>	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie	корен	41
	<i>O. paniculata</i>	корен	41
	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. confertum</i>	корен	41
	<i>O. dichroantha</i>	корен	40
	<i>O. paniculata</i>	корен	42, 41
β,β-Диметилакрилшиконин	<i>O. leptantha</i>	корен	43
	<i>O. waltonii</i>	корен	41
	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. confertum</i>	корен	41
β-Хидроксиизовалерилшиконин	<i>O. nigricaula</i>	корен	44
	<i>O. paniculata</i>	корен	42, 41
Ацетилшиконин	<i>O. paniculata</i>	корен	42, 41
	<i>O. leptantha</i>	корен	43



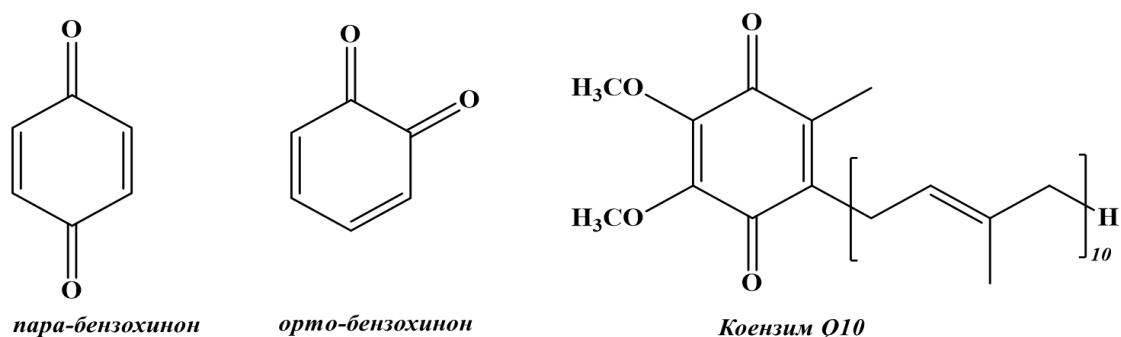
	<i>O. nigricale</i>	корен	44
	<i>O. argentatum</i>	корен	45
	<i>O. hookeri</i> Clarke	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie	корен	41
	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. waltonii</i>	корен	41
	<i>O. confertum</i>	корен	41
α-Метилбутирилшиконин	<i>O. paniculata</i>	корен	42, 41
	<i>O. hookeri</i> Clarke	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie	корен	41
	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. waltonii</i>	корен	41
Изовалерилшиконин	<i>O. paniculata</i>	корен	42, 41
	<i>O. leptantha</i>	корен	43
	<i>O. waltonii</i>	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie	корен	41
Деоксишиконин	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. confertum</i>	корен	41
	<i>O. nigricale</i>	корен	44
	<i>O. argentatum</i>	корен	45
	<i>O. waltonii</i>	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie	корен	41
3-Хидроксиизовалерил шиконин	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. paniculata</i>	корен	41
	<i>O. confertum</i>	корен	41
5,8-О-Диметил ацетилшиконин	<i>O. argentatum</i>	корен	45
	<i>O. heterophylla</i>	корен	37
Ацетиларнебин-2	<i>O. waltonii</i>	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke	корен	41
	<i>O. hookeri</i> Clarke var. <i>longiflorum</i> Duthie	корен	41
Изобутирилшиконин	<i>O. paniculata</i>	корен	41
	<i>O. exsertum</i>	корен	41
	<i>O. confertum</i>	корен	41

### 1.3. Нафтохинони

Хинони су група ароматичних једињења широко распрострањених у природи. Могу се наћи у бактеријама, гљивама, као и у вишим биљкама, најчешће као пигменти <sup>46</sup>. Хинони показују велики спектар биолошких активности попут пургативне, антимикробне и антитуморске <sup>47</sup>. Многи хинони имају важне биохемијске улоге у електрон транспортним системима дисања или фотосинтезе. Са обзиром на структуру, хинони се могу класификовати као <sup>47</sup>:

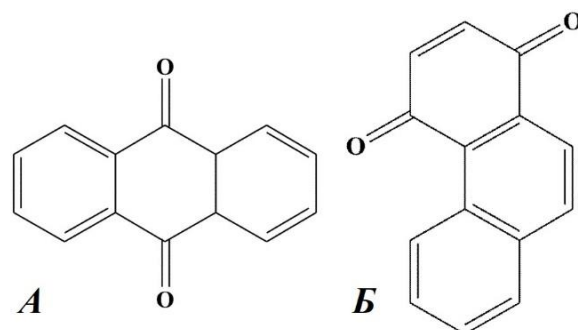
- ❖ Бензохинони
- ❖ Антрахинони
- ❖ Фенантрахинони
- ❖ Нафтохинони

*Бензохинони* су хинонски деривати који садрже циклохексадиендион скелет, а у природи су до сада нађени само пара-бензохинони и орто-бензохинони, док мета-бензохинони до сада нису идентификовани. Коензим Q10 припада класи деривата бензохинона, а користи се у третману кардиоваскуларних болести и хипертензије <sup>47</sup>. На *Слика 1.4.* приказане су структуре бензохинона <sup>47</sup>.



*Слика 1.4.* Структуре скелета бензохинона и њиховог деривата Коензима Q10

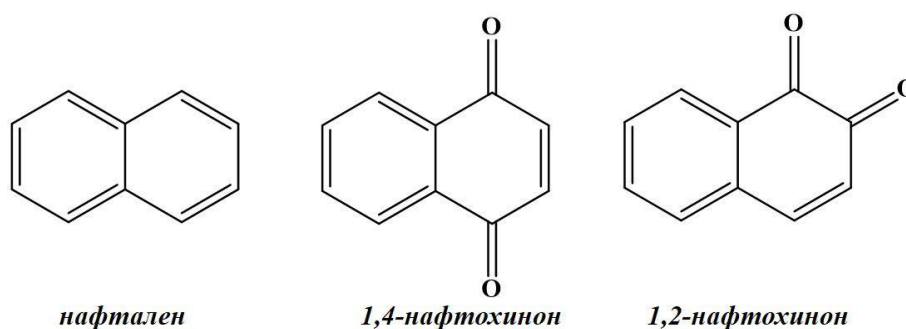
*Антрахинони* су једињења хинонског типа која имају структурне карактеристике антрацена супституисаног дионским групама у средњем ароматичном прстену чија је структура приказана на *Слика 1.5. А* <sup>47</sup>.



Слика 1.5. Структуре скелета антрахинона (А) и фенантрахинона (Б)

Фенантрахинони (Слика 1.5. Б) представљају групу хинонских деривата добијених од фенантрена чији је један ароматични прстен супституисан са две карбоксилне групе. Према позицији супституције могу се разликовати орто- и пара- фенантрахинони <sup>47</sup>.

Нафтохинони (Слика 1.6.) спадају у класу полифенола са  $C_6-C_4$  скелетом и структурно су слични нафталену. Карактеришу их две карбонилне групе које могу бити у позицијама 1 и 2 (1,2-нафтохинони) или позицијама 1 и 4 (1,4-нафтохинони), при чему су заступљенији нафтохинони са структуром у којој су карбонилне групе на месту 1 и 4 <sup>46,48-53</sup>. Нафтохинони су се традиционално употребљивали као природне боје. Коњугација између карбонилне групе и двоструке везе у прстену ових једињења огледа се у врло интензивним бојама са опсегом од жуте до црвене <sup>54</sup>.

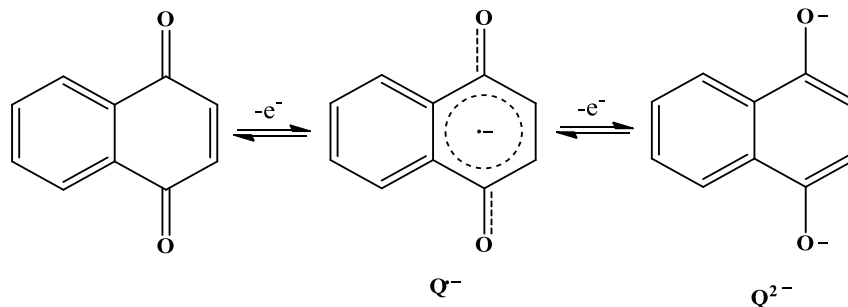


Слика 1.6. Структуре скелета нафталена и нафтохинона

Нафтохинони су група веома распрострањених секундарних метаболита у природи. Најважније биљне врсте које садрже ову групу једињења су: *Avicenniaceae*, *Vigonaceae*, *Boraginaceae*, *Droseraceae*, *Ebenaceae*, *Juglandaceae*, *Nepenthaceae* и *Plumbaginaceae* <sup>4,49,51</sup>. Поред тога што се налазе у биљкама, могу се наћи и у алгама, гљивама, а и као продукти метаболизма неких бактерија <sup>4,48,49,51,52</sup>. У биљкама се најчешће могу наћи у облику

мономера, димера, тримера и глукозида, као и у редукованим облицима <sup>4</sup>. Ова група једињења препознатљива је по обојености, па имају велику углу као боје и пигменти. Нафтохинони и њихови аналози представљају врло битне прекурсоре у синтези природних производа и фармацеутској индустрији. Њихова биосинтеза се врши различитим путевима који укључују ацетатни и малонатни пут, комбинацију шикиматског пута и пута сукцинил коензима-А, као и комбинацију шикиматског и мевалонатног пута <sup>4,50-52</sup>.

Ова група једињења учествује у многим биолошким оксидативним процесима, с обзиром на то да је основна особина хинона њихова лака редукција а самим тим и могућност да се понашају као оксидациони и дехидратациони агенси <sup>49,51,55</sup>. Њихова лака редукција се огледа у могућности хинона да прихвати један или два електрона при чему формирају одговарајуће радикал анјоне ( $Q^{\cdot-}$ ) и хидрохинон радикал анјоне ( $Q^{2-}$ ), што је представљено на *Схема 1.1.* <sup>51,54,55</sup>. Ова могућност хинона за резултат доводи до њихове аутооксидације молекулским кисеоником ( $O_2$ ), који затим прелази у супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) који се накнадно преводи у  $O_2$  и  $H_2O_2$  чиме подстиче оксидацију липида, протеина као и молекула ДНК <sup>51,53</sup>.



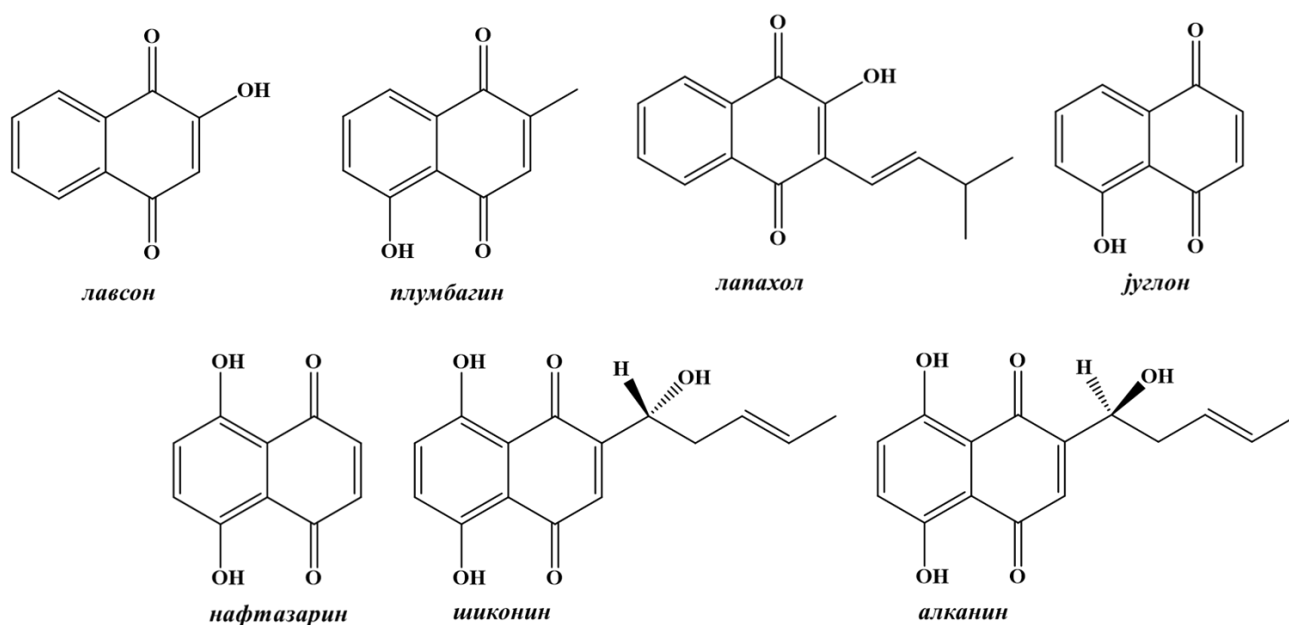
*Схема 1.1. Редокс особине нафтохинона*

У ћелијама сисара редокс реакције нафтохинона катализоване су ензимима попут NADPH-цитохром P-450 редуктазе при чему настаје семихинон, или митохондријалне NADH-убихинон оксидокредуктазе дајући хинол <sup>31,51,56-58</sup>.

Представљена особина нафтохинона као снажних инхибитора у реакцијама транспорта електрона одговорна је за широк опсег њихове биолошке активности. Познато је да испољавају антибактеријску, антифунгалну, антивирусну, антитуморску, антималяријску, инсектицидну активност, што их чини врло атрактивним за истраживаче <sup>4</sup>, <sup>46,50-54,59</sup>.

Поред тога што су учествују у редокс реакцијама хинони учествују и у реакцијама алкиловања. Алкиловање редукованог глутатиона (GSH) или цистеинских остатака протеина доводи до смањења нивоа редукованог глутатиона или модификација протеина 51,53.

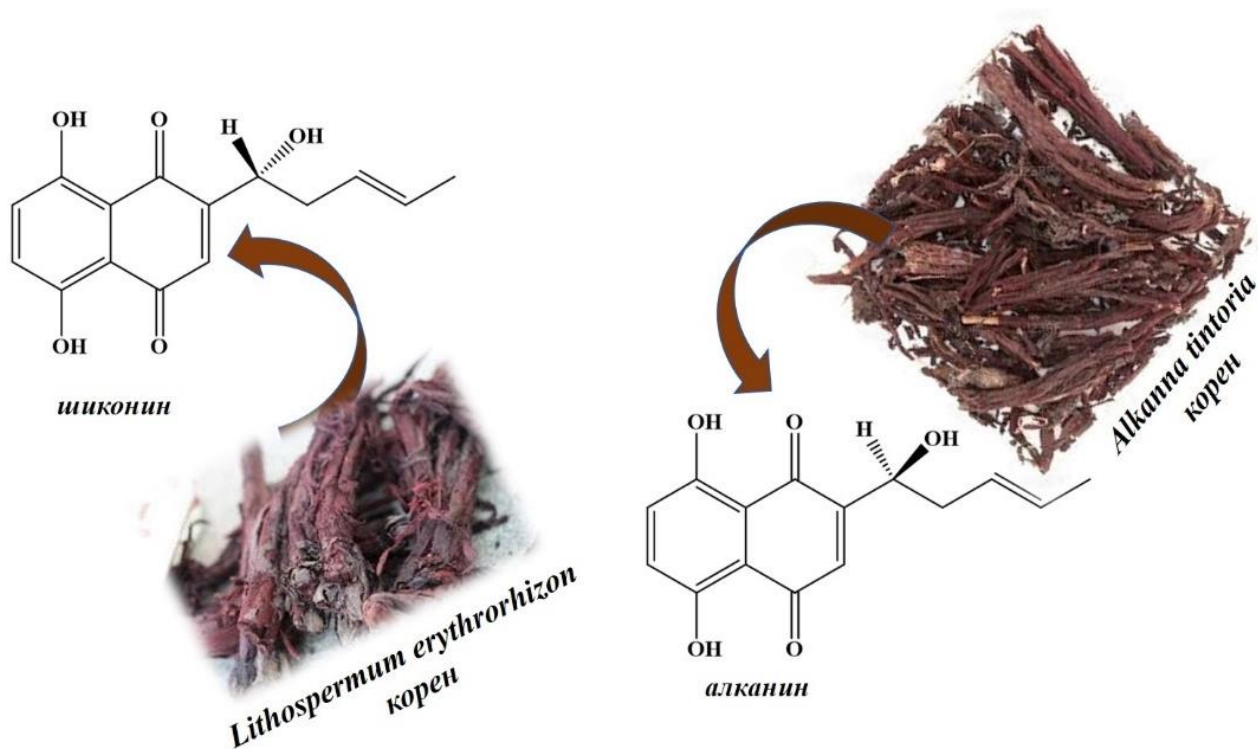
Хидроксил деривати 1,4-нафтохинона су једињења, попут самих хинона, присутна у неколико фамилија виших биљака, алгама, гљивама, у неким животињама и као продукти метаболизма код неких бактерија. У народној медицини биљке које садрже нафтохиноне се користе у третману неких патофизиолошких стања. Међу познатим хидрокси нафтохинонима (Слика 1.7.) изолованим из биљног материјала налазе се: лавсон који је изолован из листа и стабла кане (*Lawsonia inermis* L); плумбагин који се може наћи у корену *Plumbago scandens* L, а употребљава се у третману лепре и туберкулозе; лапахол који се налази у срцу дрвета биљака из рода *Tabebuia* spp., *Tecoma* spp. и *Tecomella undulata*; југлон изолован из листова, корена, орашастог плода, коре као и дрвета црног ораха (*Juglans nigra*), Европског ораха (*Juglans regia*) и Америчког белог ораха (*Juglans cinerea*); нафтазарин добијен из коре дрвета *Lomatia obliqua*; шиконин који је главни конституент корена *Lithospermum erzhrorhizon*; и алканин енантиомер шиконина изолован из биљке *Alkanna tinctoria* 4,49-51,60,61.



Слика 1.7. Структуре хидроксил деривата нафтохинона изолованих из биљака

## 1.4. Изохексенил нафтазарини, шиконин и алканин

Најпознатија група изохексенил нафтазарина нађена у природи припада групи алканина и шиконина. Богата и дуга историја стоји иза одређивања структуре и фармаколошких активности нафтохинонских деривата шиконина (R енантиомер) и његовог S енантиомера алканина (Слика 1.8.).



Слика 1.8. Структуре алканина и шиконина и изглед корена биљке из којег су изоловани

Екстракти корена биљке *Alkanna tinctoria* у Европи и биљке *Lithospermum erythrorhizon* у Азији, независно један од другог користили су се вековима уназад као природне боје, али и у терапеутске сврхе<sup>37,56</sup>. Алканин је први пут нађен у корену биљке *Alkanna tinctoria* и због своје јако црвене боје употребљавао се као боја за тканине. Први запис о употреби корена ове биљке може се наћи у раду Грчког доктора и филозофа Хипократа (четврти и пети век пре нове ере), који је описао његову употребну вредност у третману чира<sup>37,56</sup>. Такође, детаљни опис својстава ове биљке налази се и у Дискордијевој енциклопедији, „*De Materia Medica*“ која је вековима била стандардна ботаничка

литература у Европи. *Alkanna tinctoria* се користила за лечење чирева, посекотина, па чак и опекотина <sup>56</sup>. Ипак, тек 1976. године, Папагеоргиоу (Papageorgiou) је потврдио дејство лечења рана и антимикуробну активност екстракта корена *Alkanna tinctoria*, и први је идентификовао алканин као активни састојак ове биљке.

Историја која стоји иза фармаколошке употребе шиконина везана је за Далеки Исток, конкретније за Кину. Заправо, шиконин представља главни принцип „Zicao“ традиционалне биљне медицине која се заснива на осушеном корену биљке *Lithospermum erythrorhizon* <sup>62-64</sup>. Историјски записи говоре о томе да се корен ове биљке користио за третирање опекотина, аналних чирева, хемороида, инфицираних рана, стрија, екстерних рана, као и дерматитиса <sup>48,56,62</sup>.

Шиконин су први пут изоловали Курода и Мајима (Kuroda и Majima) 1922. године из биљке *Lithospermum erythrorhizon* као главни конституент црвеног пигмента корена ове биљке <sup>56,62</sup>. Структура овог молекула дуго је била предмет истраживања, с обзиром на физичке и хемијске сличности са молекулом нафтазарина. Тек 1936. године Брокман и Лиебигис (Brockmann и Liebigs) су окарактерисали шиконин као 5,8-дихидрокси-2-[(1R)-1-хидрокси-4-метил-3-пентил]-1,4-нафтохинон, и алканин као његов енантиомер <sup>56,62</sup>.

#### 1.4.1. Хемијске особине шиконина, алканина и њихових деривата

Хемијске особине изохексенил нафтазарина шиконина и алканина (Слика 1.8.) имају јако много сличности са хемијским особинама нафтазарина (1,4-нафтохинона). Ипак, бочни ланац на коме је присутна хидроксилна група код шиконина, алканина и њихових деривата има значајан утицај на њихове хемијске особине чинећи их осетљивијим од нафтазарина <sup>56</sup>.

Шиконин, алканин као и њихови деривати нису јако стабилна једињења, подложни су фотооксидацији при излагању ваздуху и светлости, као и термалној деградацији <sup>56,65</sup>. Ова једињења лако полимеризују дејством киселина, база, топлоте и светлости, а при јако киселим условима подлежу и рацемизацији <sup>56</sup>. У киселим условима, може доћи до циклизације бочног ланца до тетрахидрофуранског изомера (циклошиконин). Претпоставка је да се фотолитичка деградација одвија по механизму приказаном на *Схема 1.2.* <sup>56</sup>.

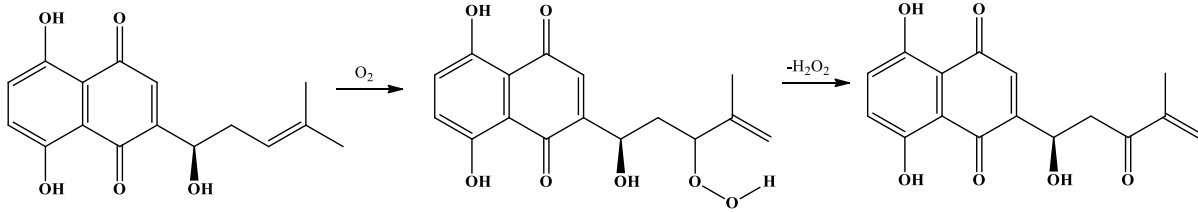


Схема 1.2. Механизам фотооксидације шиконина

Чо (Cho) и сарадници су тестирали физичку стабилност шиконина и његових деривата (деоксишиконина, ацетилшиконина, изобутирилшиконина и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина), при чему су показали да је термална деградација деоксишиконина ( $t_{1/2}=14,6$  h,  $60$  °C) и изобутирилшиконина ( $t_{1/2}=19,3$  h,  $60$  °C) већа у односу на друге деривате ( $t_{1/2}=40-50$  h), док је осетљивост ових једињења на излагање светлу сличних вредности ( $t_{1/2}=4,2-5,1$  h,  $20000$  lx интензитет светлости) <sup>65,66</sup>.

Како су изохексенил нафтазарини липофилна једињења, у циљу побољшавања њихове растворљивости, стабилности и биорасположивости, као и како би се смањило интензитет боје и постигло контролисано ослобађање, Папагеоргиоу и сарадници припремили су неколико система који укључују микрокапсуле са шиконином и алканином, као и инклузионе комплексе са циклодекстрином <sup>65-68</sup>.

#### 1.4.2. Биосинтеза шиконина

Биљке богате шиконином морају да расту пет до седам година пре него што концентрација шиконина у корену достигне вредност од једног или два процента. Из овог разлога многе истраживачке групе биле су мотивисане да добију шиконин из култура биљних ћелија. Резултат ових истраживања довео је и до разумевања биосинтетичких путева шиконина као и сродних једињења <sup>48,56</sup>.

Прихваћени пут биосинтезе шиконина почиње од два кључна прекурсора 4-хидрокси бензоеве киселине (РНВ) и геранил фосфата (GPP), а катализована је ензимом РНВ геранил-трансферазом при чему настаје *m*-геранил-РНВ <sup>31,48,51,56,61,69-71</sup>.

Геранил фосфат (GPP) настаје из изопреноидног биосинтетског пута који почиње са три молекула ацетил-коензима А (ацетил-СоА) до формирања мевалонске киселине. Мевалонска киселина се затим серијом реакција трансформише до фосфорилисаног



изопрена од пет С атома. Ове реакције започињу фосфорилацијом примарне алкохолне групе, а захтевају два различита АТФ-зависна ензима при чему настаје дифосфат мевалонске киселине из које се декарбоксилацијом/дехидратацијом добија изопентил дифосфат (IPP). IPP затим изомеризацијом даје диметилалил дифосфат (DMAPP) уз присуство ензима изомеразе који стереоспецифично отклања  $\text{pro-R}$  протон ( $\text{H}_R$ ) са С-2 угљениковог атома и инкорпорира протон из воде на С-4 угљеников атом. Комбинацијом DMAPP и IPP настаје GPP. Предпоставља се да ова реакција укључује јонизацију DMAPP до алилног катјона, а затим и адисију на двоструку везу IPP која је праћена губитком протона (Схема 1.3.)<sup>48,51,72</sup>.

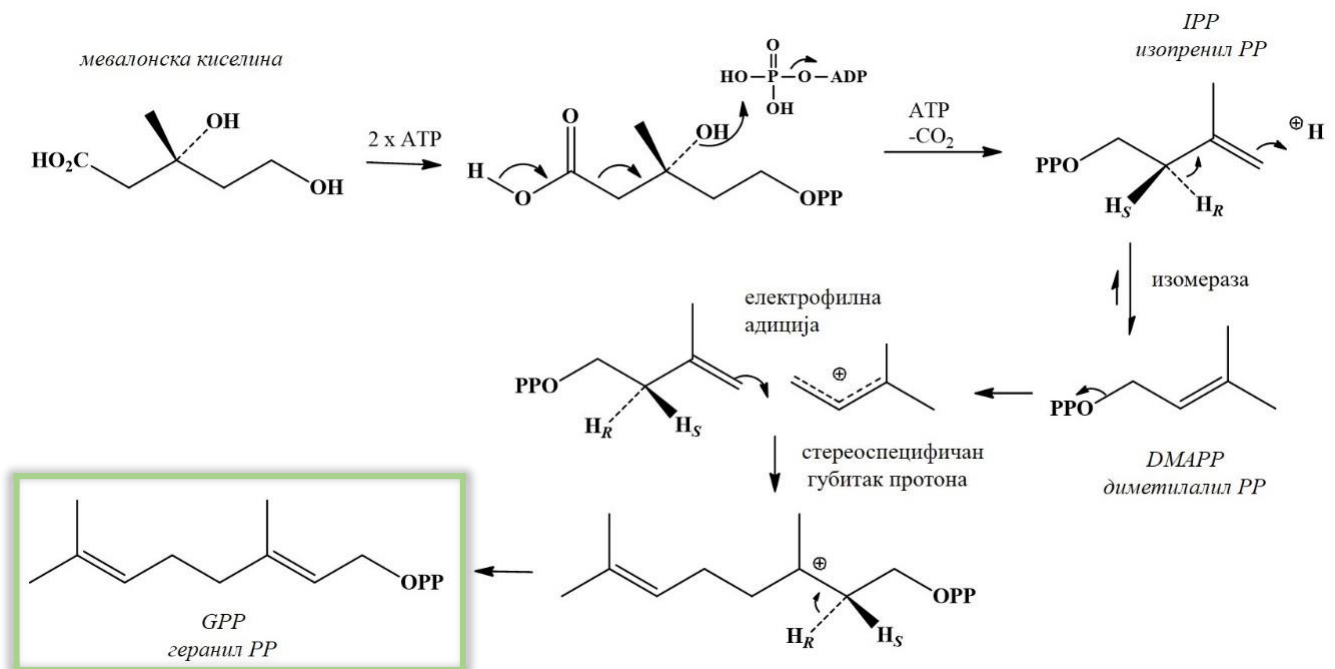


Схема 1.3. Биосинтеза геранил дифосфата

*РНВ* (4-хидрокси бензоева киселина) настаје из шикимског пута преко L-фенилаланина. Пре L-фенилаланина битан прекурсор који настаје из пута шикимске киселине је хоризминска киселина која је субстрат за бисинтезу ароматичних аминокиселина као и великог броја других секундарних метаболита. Пут преко L-фенилаланина започиње фосфорилацијом шикимске киселине у простој АТФ (аденозин трифосфат) зависној реакцији фосфорилације дајући за производ 3-фосфат шикимску киселину. У реакцији катализованој ензимом EPSP синтетаза овај фосфорилисани интермедијер се даље комбинује са молекулом PEP-а (фосфоенолпирувата) дајући 3-

фосфат-3-енолпирувилшикимску киселину (EPSP). Да би EPSP извршио трансформацију до хоризминске киселине захтева реакцију 1,4-елиминације фосфорне киселине, након чега се од хоризмиске киселине добијају ароматичне аминокиселине L-фенилаланин и L-тирозин (Схема 1.4.)<sup>48,51,72</sup>.

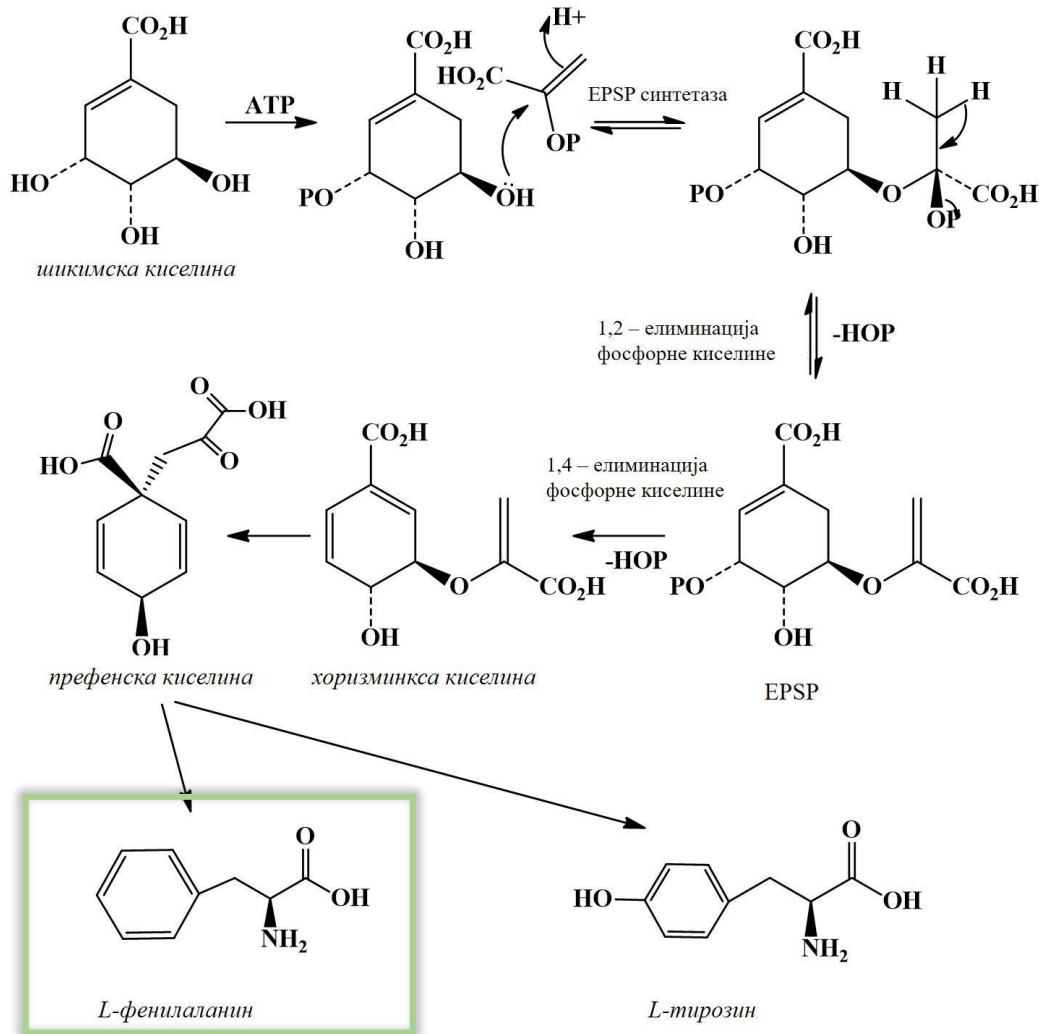
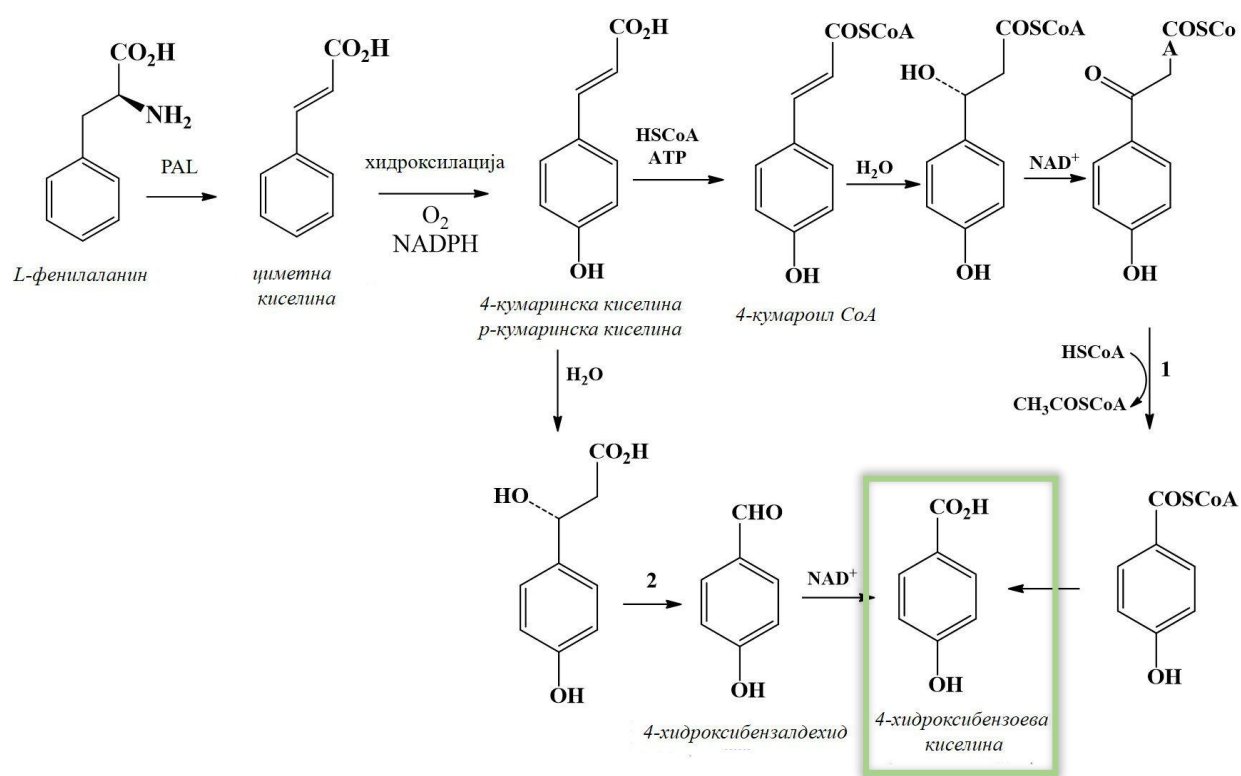


Схема 1.4. Биосинтеза L-фенилаланина из шикимске киселине

L-фенилаланин је гравивна основа C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> система великог броја природних производа, па се из њега може добити и циметна киселина при чему је први корак најчешће елиминација амонијака из бочног ланца уз помоћ ензима фенилаланинске амонијак-лијазе (PAL). Како би из циметне киселине настао P<sub>НВ</sub> неопходно је увођење коензима А, након чега следи хидратација слична оној које ја заступљена приликом процеса β-оксидације код масних киселина како би се увела хидроксилна група. Уведена хидроксилна група се затим

оксидује до кетона након чега  $\beta$ -кетоестар губи ацетил коензим А реверзном Клајзеновом (Claisen-овом) реакцијом дајћи коензим А естар 4-хидроксибензоеве киселине (пут 1 са *Схема 1.5.*)<sup>48,51,72</sup>.

Иако је овај механизам општеприхваћен, постоје и докази који подржавају други прилаз који карактерише директна хидратација двоструке везе бочног низа, док се само скраћивање низа одиграва повратном алдолном реакцијом, при чему се генерише 4-хидроксибензалдехид. РНВ се затим формира преко  $\text{NAD}^+$ -зависне оксидације (пут 2 *Схема 1.5.*)<sup>48,51,72</sup>.



*Схема 1.5.* Биосинтеза 4-хидроксибензоеве киселине од *L*-фенилаланина

Да биосинтеза шиконина иде по путу представљеном на *Схема 1.6.* постоји више доказа. Заправо, РНВ, *m*-геранил-РНВ и *m*-геранилхидрохинон су изоловани из ћелија биљке *Lithospermum erythrorhizon* гајеним у течном медијуму у којем је инхибирана биосинтеза шиконина. Како је РНВ токсичан за ћелије, његова акумулација се дешава у вакуолама ћелија у којима нема шиконина у облику  $\beta$ -D-глукозида (РНВОГ). Интермедијери до *m*-геранил-РНВ-а детектовани су у овим ћелијама, па се претпоставља да

амонијум-јони сузбијају њихово превођење у *m*-геранилхидрохинон. Када се ћелије пренесу у медијум који индукује синтезу шиконина, количина РНВОГ се значајно смањује, што је директна потврда да су РНВ и РНВОГ интермедијери у овом биосинтетичком путу. Томојоки Окамото (Tomoyuki Okamoto) и сарадници су 1995. године доказали и да је деоксишиконин биосинтетички прекурсор шиконина, што представља једини директан доказ који следи након настајања *m*-геранилхидрохинона, а да су сви остали кораци претпостављени <sup>73</sup>.

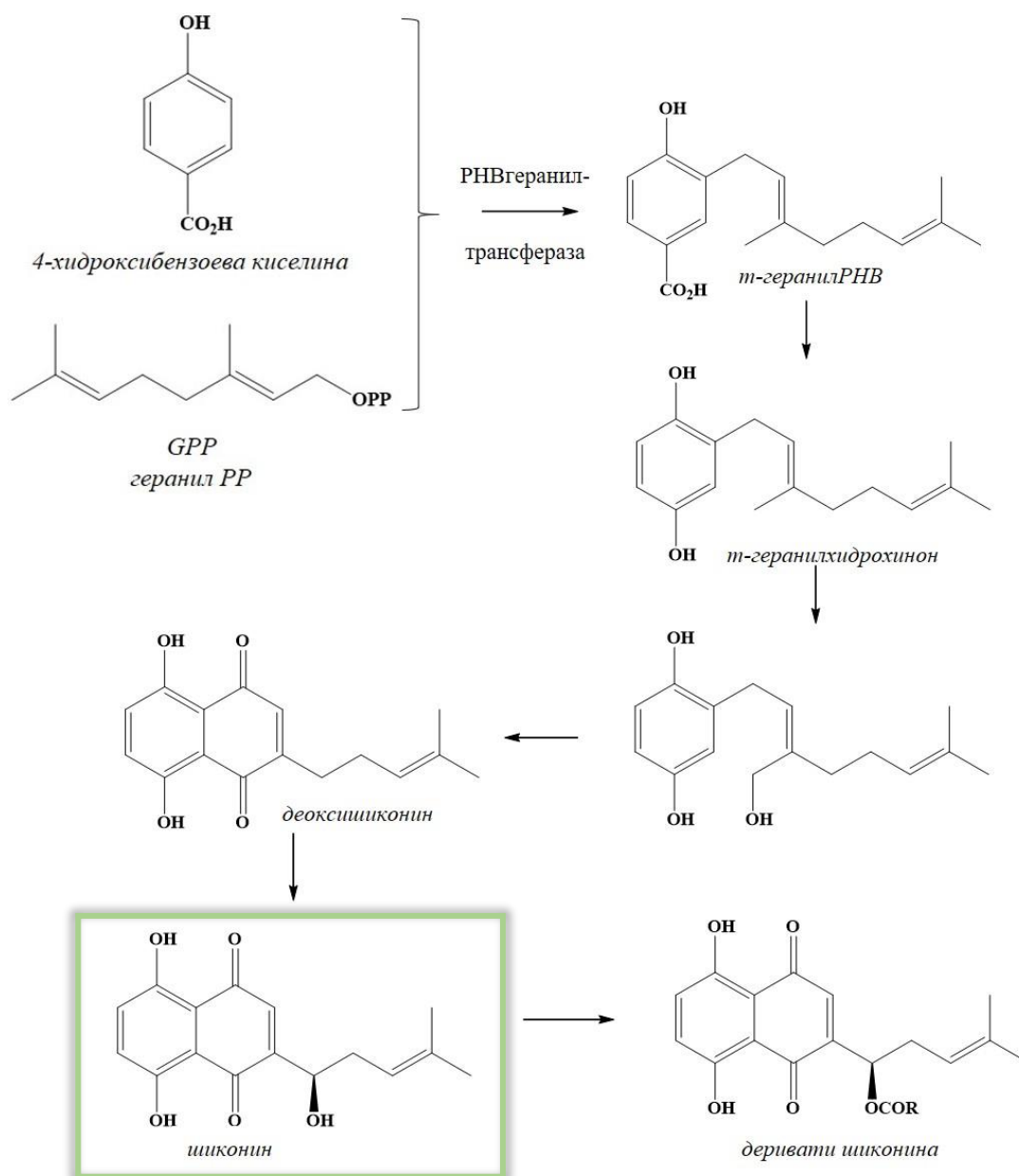


Схема 1.6. Биосинтеза шиконина из 4-хидроксибензојеве киселине и геранил фосфата

## 1.5. Биолошка активност шиконина и његових деривата

Изохексенил нафтазарини, алканини или шиконини су предмет многих истраживања услед тога што поседују различите нивое биолошких активности<sup>48,56,61,73</sup>. Шиконин и његови деривати представљају комерцијално најзначајније нафтохинонске пигменте, а данас се користе како у медицинске и козметичке сврхе, тако и као боје у Јапану, док се у Европи и Сједињеним Америчким Државама алканин употребљава као боја у храни и козметичким производима<sup>48,59,64</sup>.

Последњих двадесет пет година многе истраживачке групе бавиле су се испитивањем биолошких активности поменутих изохексенил нафтазарина. Као њихови главни биолошки значајни ефекти наводе се антитуморска, антимикробна и антитромботска својства, антиинфламаторни ефекат као и примена ових једињења у зацеливању рана<sup>56,62</sup>.

### 1.5.1. Антимикробна активност

Иако је данас направљен велики напредак у пољима медицинске технологије као и у научним сазнањима у пољу механизма настанка инфективних болести, оне су и даље водећи узрок великог морталитета у свету<sup>75</sup>. Појава резистенције на антибиотике који су тренутно у употреби је све већа, и доводи до континуираног истраживања у циљу проналаска нових антимикробних агенаса<sup>76</sup>. Како биљке имају способност да синтетишу велики број једињења различитих структура, посматрају се као обећавајући извор антимикробних агенаса који се могу као такви употребити или се могу користити у дизајну нових агенса.

Како су се сирови препарати добијени од корена биљака које садрже шиконин, алканин и њихове деривате традиционално употребљавали као антимикробни агенси, било је потребно доказати да су ови деривати нафтохинона заправо активне компоненте препарата. Многе истраживачке групе су се у последњих тридесет година бавиле испитивањем антимикробне активности нафтохинона из групе шиконина и алканина<sup>56,62</sup>. Иако су прва истраживања сугерисала да шиконин и алканин показују бактериостатски ефекат, новија кинетичка истраживања су доказала да ова једињења заправо испољавају бактерицидно дејство<sup>56,62</sup>. Шиконин је показао дејство према Грам-позитивним

бактеријским сојевима *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis* са вредностима минималне инхибиторне концентрације (МИС) између 0,3 и 6,25 µg/mL, док активност према Грам-негативним бактеријским сојевима (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Micrococcus luteus*) није примећена<sup>56,62</sup>. Екстензивне студије су показале да је шиконин активан и према метицилин-осетљивој и метицилин-отпорној *S. aureus* са МИС вредношћу од 6,25 µg/mL<sup>56,64</sup>. У истој студији шиконин је показао активност и према ванкомицин-отпорним *E. faecium* и *E. faecalis* са МИС вредностима од 50 µg/mL и 25 µg/mL<sup>62</sup>. Дамианкос (Damianakos) и сарадници су 2012. године констатовали да алканин и његови деривати испољавају активност према различитим сојевима микроорганизама, при чему је ацетилшиконин показао јачу активност у поређењу са његовим енантиомером ацетилалканином<sup>77</sup>. Дозно-зависна активност шиконина примећена је и на соју *Helicobacter pylori*<sup>78</sup>.

Литературни подаци о антифунгалним својствима шиконина и његових деривата углавном су опречни. На највећа неслагања наилазило се када је у питању сој *Candida*. Иако постоје подаци да су шиконин и његови деривати активни према овој гљиви, постоје и многе истраживачке групе које су показале да су ова једињења неактивна према овом соју гљиве<sup>4,56,62,64</sup>. Ипак, новија истраживања која су 2002. године спровели Сасаки (Sasaki) и сарадници указала су на активност шиконина, деоксишиконина, ацетилшиконина и β-хидроксиизовалерил шиконина према *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon cutaneum* и *Aspergillus fumigatus*<sup>79</sup>. Андужар (Andújar) и сарадници су показали да померање митохондријалног аеробног дисања и повећање ендогених кисеоничних врста може допринети побољшаној активности шиконина према соју *Candida*<sup>56</sup>. Папагеоргиу (Papageorgiou) и сарадници су 1999. године забележили антидерматофитско дејство шиконина и деоксишиконина према *Saccharomyces sake*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsulans* var. *sulfureum*, *Microsporum gypseum*, и *Epidermophyton floccosum* са МИС вредностима мањим од 25 µg/mL, при чему је њихово дејство фунгистатично, а активност деоксишиконина већа је у поређењу са шиконином<sup>56,62</sup>. Такође, исти аутори су забележили и активност шиконина према врсти амебе *Entamoeba histolytica* и ларве *Aedes aegypti*<sup>56,62</sup>.

Антимикробна активност шиконина са структурног аспекта може се објаснити присуством нафтазаринског прстена, при чему алкиловање фенолних група овог молекула, као и њихова полимеризација доводе до потпуног губитка активности. Како су шиконин, алканин и њихови естри показали антимикробну активност, претподставља се да бочни ланац нафтазаринског прстена служи као систем за испоруку<sup>56</sup>.

### 1.5.2. Антитуморска активност

Према Светској здравственој организацији канцер је један од главних узрока смртности код људи, а радикални приступи у контроли већине карцинома као што су хирургија, радиотерапија или хемотерапија нису се показали јако успешним у контроли инциденције већине карцинома. Тренутно је фокус многих научних група на откривању нових, ефикасних лекова у третману канцера<sup>49,80</sup>. Масовни скрининг програми Националног института за рак (NCI) у САД у области природних производа и синтетичких једињења, идентификовали су хинонску структуру као фармакофору која има могућност индукције цитотоксичне активности<sup>56,64</sup>. Последњих двадесет пет година шиконин, алканин и њихови деривати се екстензивно изучавају као потенцијални кандидати у лечењу канцера<sup>56,64</sup>.

Према досадашњим истраживањима шиконин и његови деривати су показали значајну антитуморску активност у *in vitro* и *in vivo* условима према различитим врстама ћелија рака, као што су ћелије леукемије, рака дојке, глиома, рака мокраћне бешике и ћелија рака плућа<sup>56,62,64,70</sup>. Механизам антитуморске активности ове групе једињења зависи од врсте ћелија канцера, као и од самог начина његовог лечења. Према многобројним литературним подацима постоји много различитих механизма по којима шиконин и његови деривати инхибирају индукцију пролиферације у *in vitro* условима у ћелијама канцера, на пример индукцијом ћелијске смрти (апоптозом, аутофагијом, некроптозом), инхибицијом гликолизе, канцерогенезе и метастазе. Могућност шиконина да различитим начинима деловања доведе до ћелијске смрти може бити повољна да се избегне или бар одложи развој отпорности ћелија канцера на третман овим једињењем.

Према до сада објављеним литературним подацима апоптоза је један главних механизма индуковања ћелијске смрти у третману шиконином. Апоптоза, програмирана

ћелијска смрт, настаје као последица активације каспаза, а карактерише је отицање ћелијске мембране, скупљање ћелија, фрагментација нуклеуса, кондензација хроматина и фрагментација молекула ДНК (Слика 1.9). У Табела 1.3. приказани су неки од молекуларних начина на које шиконин индукује апоптозу у различитим ћелијама канцера *in vitro*. Апоптоза индукована шиконином најчешће се дешава услед генерисања реактивних кисеоничних врста (ROS), супресијом (NF)- $\kappa$ B сигналног пута, активацијом каспазе -9, -8 и -3, ослобађањем митохондријалног протеина цитохрома c, регулацијом протеина p53, застојем ћелијског циклуса са истовременим смањењем регулације циклин зависних протеина, смањењем експресије Bcl-2 и повећањем експресије Bax<sup>56,62,64,70,81-89</sup>.

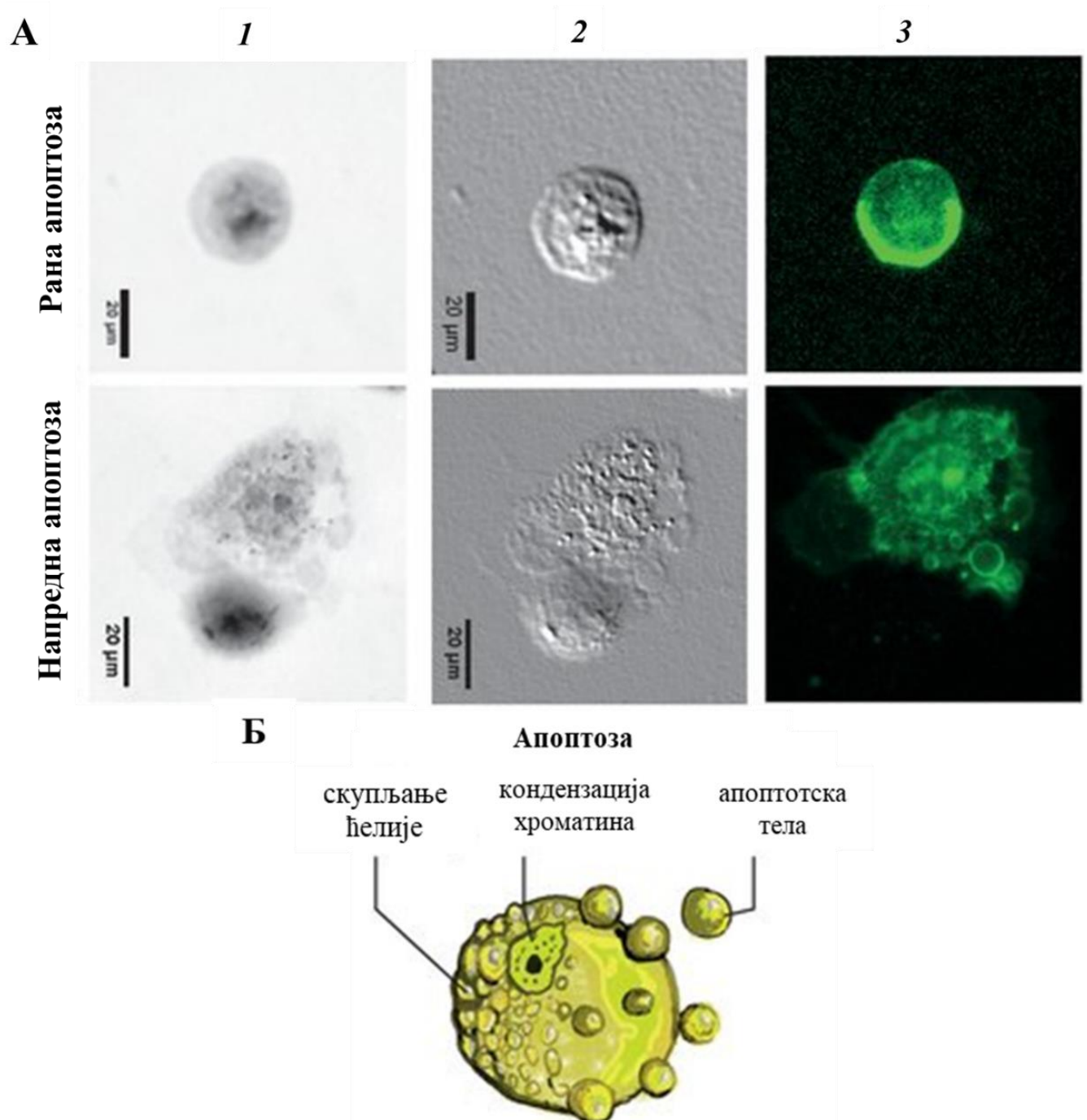
**Табела 1.3.** Механизми индукције апоптозе шиконином у ћелијским линијама канцера *in vitro*

Ћелијска линија	Тип ћелије	Механизам активности	Реф.
<i>Ћелијски циклус:</i>			
SMMC-7721	Хепатом	Индукција апоптозе инхибицијом напредовања ћелијског циклуса, поремећајем хомеостазе Ca <sup>2+</sup> , индукцијом оксидативног стреса и дисфункцијом митохондрија	91
MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 M10	Канцер дојке Млечне епителне ћелије	Индукција застоја ћелијског циклуса и апоптозе стимулацијом DUSP1 и DUSP2 експресије која искључује JNK и p38 MAPK путеве	92
EC109, EC9706	Канцер једњака Епителне ћелије једњака	Индукција застоја ћелијског циклуса и апоптозе регулацијом HIF1 $\alpha$ /PKM2 сигналних путева	93
HCT-116, SW-620	Канцер дебелог црева	Застој ћелијског циклуса инхибицијом сигнала HIF1 $\alpha$	94
A-549	Аденокарцином плућа	Инхибиција раста ћелија и ћелијског циклуса регулацијом CCND1	95
AGS	Канцер желуца	Индукција застоја ћелијског циклуса преко Egr1-p21 сигналног пута	96
8505C8305C, FTC133, VCPAP, TPC1C643INH4, K	Тироидни канцер	Индукција застоја ћелијског циклуса	86
Htori	Имобилисане тироидне епителне ћелије		
<i>Гликолиза:</i>			
C6	Глиом пацова	Активација RIP1 и RIP3 води до супресије гликолизе повећањем нивоа интрацелуларног H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	97
SHG-44, U87, U251	Хумани глиом		
A2780	Цисплатина-сензитивни и	Пригушење епително-мезенхималног прелаза	98



	резистентни карцином јајника		
SKOV-3	Паклитаксел- сензитивни и резистентни карцином јајника		
MCF-7	Канцер дојке	Инхибиција гликолитичких ензима	99
Huh7	Хепатом	Инхибиција раста модификацијом ћелијског метаболизма	100
JB6 Cl-41 (P+)	Епидермалне ћелије коже миша	Супресија промотора тумора 12-О- тетрадеканоиловобол 13-ацетата и активација PKM2	101
MCF-7, MCF-7/Adr, MCF-7/Bcl-2, MCF- 7/Bcl-xL, MCF-7/Neo	Канцер дојке	Инхибиција гликолизе инхибицијом тумор специфичног PKM2	102
A549	Канцер плућа		
HeLa	Канцер грлића материце		
<i>Метастаза:</i>			
23, A549, HCC827	Неделоћелијски карцином плућа	Инхибиција миграције и инвазије инхибицијом епителијског мезенхималног прелаза	103
U2OS	Остеосарком	Инхибиција инвазије смањењем нивоа MMP-13 и повећањем нивоа TIPE2	104
SKOV-3	Канцер јајних ћелија	Инхибиција ћелијске миграције инхибирањем SRC и FAK	105
PC-3, DU145	Канцер простате	ROS/ERK1/2- и AKT/mTOR посредована инхибиција ћелијске инвазије смањењем експресије MMP-2 / -9	106
MCF-7, MDA-MB- 231	Канцер дојке	Инхибиција инвазије инхибицијом промоторне активности и експресије MMP-9	107
8505C8305C, FTC133, VCPAP, TPC1C643INH4, K Htori	Тироидни канцер	Инхибиција ћелијске миграције и инвазије	86
A549	Имобилисане тироидне епителне ћелије		
A549	Неделоћелијски карцином плућа	Инхибиција инвазије и метастазе супресијом интегрин $\beta 1$ експресије и ERK1/2 сигнализације	108
ACC-2, ACC-M	Аденоидни цистични карцином	Инхибиција инвазије смањењем експресије MMP- 9	109
<i>Оштећење ДНК:</i>			
A375-S2	Хумани малигни меланом	Индукција апоптозе оштећењем ДНК и активацијом p53 и каспазе -9	87
<i>Упала:</i>			
SW1353, 184B5/HER	Хондросарком	Инхибиција COX-2	110
<i>Ангиогенеза:</i>			
	Ендотелне ћелије пупчане врпце	Индукција ангиогенезе инхибицијом VEGF и смањењем регулације експресије uPA	111

Преузето и модификовано из Voulos et al. 2019.<sup>70</sup>



**Слика 1.9.** Морфологија апоптичних ћелија. (А) Карактеристике апоптотских ћелија (1) изглед под мултимодалним холографским микроскопом; (2) симулирани DIC (диференцијални интерференцијски контраст) увећање од 20 пута изведено је помоћу МНМ; (3) Annexin V бојење за потврду промена у ћелијској мембрани. Апоптотске ћелије су приказане у почетном кораку (горе) где су ћелије обично округлог облика и у напредном (доле) кораку са стварањем апоптотских тела (Б) Илустровани приказ апоптотске ћелије. Преузето и модификовано из Balvan J. et al. 2015.<sup>90</sup>

Ћелијска смрт изазвана шиконином може бити и последица аутофагије. Аутофагија представља катаболички процес лизозомски зависне деградације цитоплазматског садржаја помоћу аутофагних вакуола, а активира се у туморским ћелијама као одговор на различите врсте стреса. У случају када се аутофагија прекомерно активира долази до ћелијске смрти. Ши и Цао (Shi и Cao) су показали да је шиконин стимулисао аутофагију у ћелијама канцера панкреаса преко PI3K/AKT сигналног пута <sup>112</sup>.

Третман ћелија канцера високим концентрацијама шиконина може за последицу имати и некроптозу “програмирану некрозу“ као тип ћелијске смрти. До некроптозе долази на каспаза независан начин, а доводи до губитка интегритета плазма мембране, отицања органела и пуцања ћелијских мембрана. Стимулација некроптозе представља један од приступа за превазилажење отпорности ћелија канцера на апоптозу. Третман шиконином је преко некроптозе заобишао резистенцију на лекове који изазивају апоптозу посредовану Bcl-2 и Bcl-xL у ћелијама канцера дојке. На исти начин шиконин је индуковао некроптозу и у ћелијама рака дојке окарактерисану прекомерном експресијом Р-гликопротеина и повишеном резистенцијом на лекове попут Винка алкалоида, таксана и антрациклина <sup>70</sup>.

Антитуморска активност шиконина *in vivo* први пут је потврђена на мишијем саркому 180 при концентрацији шиконина од 5-10 mg/kg/дан 1977 године <sup>113</sup>. Такође, 1991. Гуо (Guo) и сарадници су показали да је смеша која у себи садржи шиконин ефективна у случају третмана пацијената са дијагнозом рака плућа у каснијој фази који нису били кандидати за операцију, радиотерапију и хемотерапију <sup>114</sup>. Новија истраживања су показала да шиконин индукује антитуморску активност у *in vivo* системима стимулацијом апоптозе, аутофагије, некроптозе као и инхибицијом ангиогенезе <sup>70</sup>.

Шиконин и његови деривати нису испитивани само као антитуморски већ као и хемопревентивни агенси. Хемопревенција се заснива на идеји да неканцерогени природни или синтетички производи могу инхибирати карциногенезу. Према литературним подацима шиконин је у *in vivo* експериментима показао хемопревентивни ефекат у азоксиметаном изазваном карциному црева код пацова, спречавајући његов рани развој <sup>115,116</sup>. Такође, хемопревентивни третман шиконином инхибирао је стварање тумора коже у хемијски индукованом моделу карциногенезе коже код мишева <sup>70</sup>.

Антитуморска активност шиконина и његових деривата је испитивана и у комбинованим терапијама са хемотерапеутицима попут цисплатине, доксорубицина, адриамицина, таксола и гемицитабина <sup>71</sup>.

Један од предложених механизма цитотоксичног ефекта ове групе једињења се заснива на електрофилним реакцијама хинона са ћелијским нуклеофилима <sup>58</sup>. Мур (Moore) је први представио механизам биоредуктивног алкиловања, по којем ова група једињења подлеже реакцији редукције која подстиче елиминацију погодне позициониране одлазеће групе, дајући добар алкилујући агенс. Овако настао електрофил може „ухватити“ ћелијске нуклеofile, попут глутатиона или молекула ДНК, и довести до ћелијске смрти (Схема 1.7.) <sup>71,117</sup>.

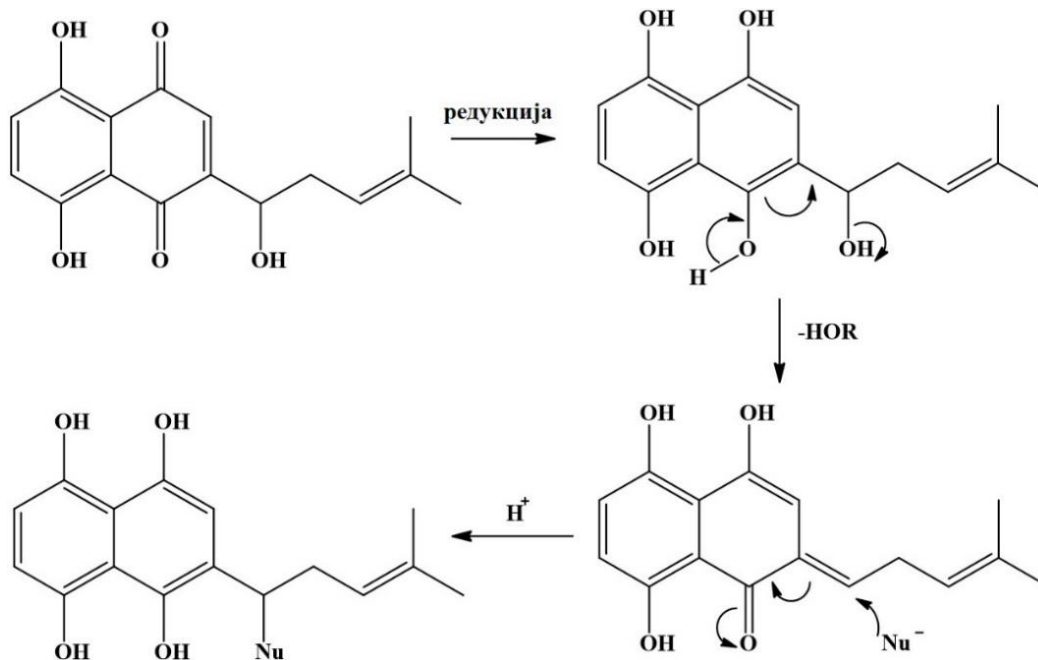


Схема 1.7. Биоредуктивно алкиловање; Nu-нуклеофил

Ипак, индукција реактивних кисеоничних врста, односно узроковање оксидативног стреса представља један од најчешће предлаганих механизма којима ова група једињења изазива цитотоксичну активност у туморским ћелијама <sup>58,71,82,84,86,89</sup>. Овај процес катализован је митохондријалним комплексом II, липоксигеназом и NADPH оксидазом. Генерисањем реактивних кисеоничних врста шиконин изазива промене у MAPK сигналном путу, доводи до дисфункције митохондрија и активације каспаза <sup>70</sup>.

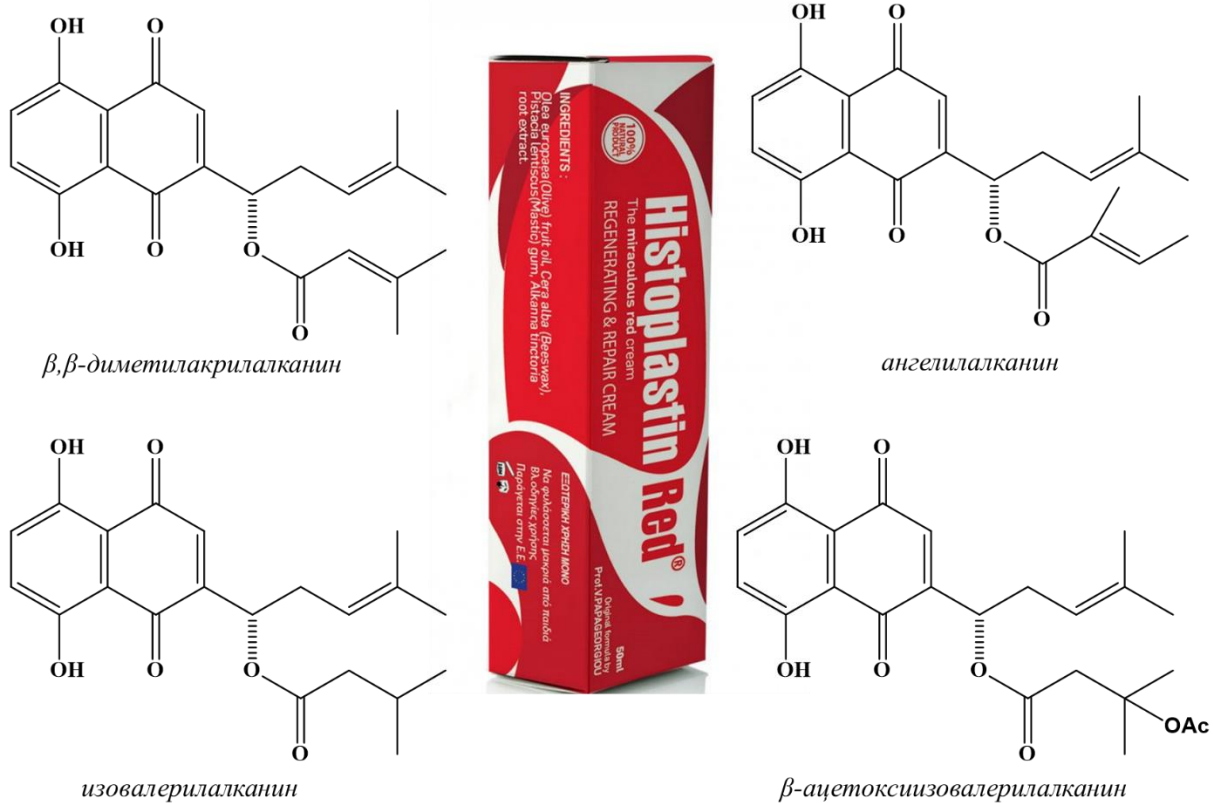
Са хемијске стране гледишта, шиконин је липофилно једињење са кратким полуживотом и лошом биорасположивошћу. Ове особине ограничавају његову употребу као ефикасног антиканцерогеног агенса. Како би се ова ограничења превазишла развијене су нове методе попут енкапсулирања шиконина са етилцелулозом, желатином, биоразградивим и биокompatibilним материјалима, и мешање са фармацеутски безбедним протеинима<sup>70</sup>.

### 1.5.3. Анти-инфламаторни ефекат

Анти-инфламаторни ефекти шиконина годинама су проучавани на животињским моделима, а потенцијални механизам деловања испитиван је *in vitro*.

Корени биљака *Lithospermum erythrorhizon* и *Alkanna tintoria* од давнина се користе у лечењу рана, али тек 1976. године Папагеоргиоу (Papageorgiou) је експериментално потврдио ово лековито својство и идентификовао одговорне активне компоненте из биљке *Alkanna tintoria*<sup>118</sup>. У овој студији, фракционисањем екстракта биљке *Alkanna tintoria*, фракција која садржи нафтохинонске пигменте показала је одличне ефекте на чиреве коже изазване на лабораторијским животињама. Хемијска анализа ове фракције указала је на присуство естара из групе алканина и то  $\beta,\beta$ -диметилакрилалканина, ангелилалканина, изовалерилалканина и  $\beta$ -ацетоксиизовалерилалканина (Слика 1.10.), док алканин у слободној форми није идентификован.

Ова истраживања су за резултат дала патент, маст хистопластин ред (*Histoplastin red*<sup>®</sup>) која је клинички тестирана на пацијентима са дијагнозом чира ноге, за који су претходни третмани били неподобни. Потпуно излечење након употребе ове масти примећено је након пет до шест недеља, а стопа успешности у лечењу је око 80 % без запажене инфламације коже у било којој фази третмана<sup>56</sup>. Ефикасност ове масти потврђена је и на опекотинама где се показала боље од лекова попут бетадина (Betadin) и фуцидина (Fucidin), а примењивана је и у третманима других врста чирева.



Слика 1.10. Структуре естара из групе алканина изолованих из биљке *Alkanna tintoria* и активни принципи масти *Histoplastin red*<sup>®</sup>

Поред деривата алканина, шиконин и његови деривати испитивани су *in vivo* у третманима отворених рана. У Јапану 1977. године Хајаши (Hayashi) је испитивао на пацовима ефикасност шиконина и ацетилшиконина у лечењу рана, при чему је показао да ова једињења имају анти-инфламаторну активност против изазваног акутног едема (хистамином, сератонином, топлотом и UV зрачењем), благе антипиретичке и аналгетичке ефекте, а и ефикасни су у зацељивању рана<sup>56,116</sup>.

Озаки (Ozaki) и сарадници су испитивали екстракте корена биљке *Lithospermum erythrorhizon* богате шиконином и његовим дериватима, односно *Macrotomia euchroma* богате дериватима алканина, и закључили да активност искључиво зависи од количине нафтохинонских пигмената, а да је независна од стереохемије бочног ланца или алифатичне естарске групе<sup>56</sup>. Студија коју су спровели Ванг (Wang) и сарадници 1994. такође је показала да анти-инфламаторна активност шиконина и његових деривата (ацетилшиконина,

деоксишиконина,  $\beta,\beta$ -диметилакрилшиконина и 1,4-нафтохинона) зависи само од 1,4-нафтохинонског скелета <sup>116</sup>.

Механизам анти-инфламаторног деловања шиконина и његових деривата до сада није тачно одређен, али новије студије показују да ова једињења имају улогу у инхибицији биосинтезе леукотриена  $B_4$  и 5-хидроксикосатетраенолне киселине, супресији дегранулација мастоцита, инхибицији респираторног распада у неутрофилима, промени сигнализације посредоване фосфатидилинозитолом, и у блокирању везивања хемокина на ССР-1 <sup>56,62,116</sup>. У једној студији Коуроунакис (Kourounakis) и сарадници су анти-инфламаторну и анти-улцеративну активност шиконина, алканина и нафтазарина једним делом приписали њиховом антиоксидативном ефекту <sup>119</sup>.

#### 1.5.4. Антиоксидативни ефекат

Познато је да нафтазарини учествују у многим биолошким оксидативним процесима, а за биолошке активности шиконина и његових деривата попут зацељивања рана, антитуморксе и антимикробне активности се сугерише да су последица њиховог антиоксидативног ефекта.

Везу између структуре и антиоксидативне активности шиконинских деривата донекле су успоставили Асимопоулоу (Assimopoulou) и сарадници 2005. године <sup>120</sup>. Показано је да мономерни и олигомерни алканин и шиконин, као и њихови естри показују изузетно велику антиоксидативну активност. На основу резултата закључено је да је присуство нафтохинонског прстена неопходно за приказану активност, док бочни ланац игра мању улогу <sup>120</sup>. Међутим, новија истраживања су показала да присуство хидроксилне (ОН) групе у бочном ланцу повећава активност деривата шиконина <sup>121</sup>.

Гао (Gao) и сарадници су испитивали антиоксидативну способност шиконина према синглетном кисеонику ( $^1O_2$ ), супероксид анјон радикалу ( $O_2^{\cdot-}$ ), *t*-бутил пероксирадикалу ( $BuOO^{\cdot}$ ) и липидној пероксидацији <sup>122</sup>. У овој студији показано је да је шиконин према  $^1O_2$  и  $O_2^{\cdot-}$  врстама рекативнији од аскорбинске киселине и  $\alpha$ -токоферола, а према  $BuOO^{\cdot}$  и липидној пероксидацији показује већу активност од  $\alpha$ -токоферола <sup>122</sup>. Венг (Weng) и сарадници су испитивали антиоксидативну активност екстракта *Lithospermum erythrorhizon* и изолованих једињења шиконина, ацетилшиконина, и  $\beta,\beta$ -диметил-акрилшиконина у

поређењу, и синергистички са  $\alpha$ -токоферолом и бутилхидрокситолуеном (ВНТ) <sup>119</sup>. Шиконин и његови естри показали су бољу активност од стандардних антиоксиданаса ( $\alpha$ -токоферола и бутилхидрокситолуена) при већим концентрацијама, док је при нижим концентрацијама запажен бољи антиоксидативни ефекат стандардних једињења. При испитивању синергистичког ефекта изолованих једињења и стандардних антиоксиданаса примећена је боља антиоксидативна активност синергије једињења и  $\alpha$ -токоферола.

Утицај шиконина и његових деривата испитиван је у уљаним супстратима, при чему је показано да присуство ових изохексенил нафтазарина значајно успорава брзину оксидације маслиновог уља и масти <sup>121</sup>. Антиоксидативна способност шиконина нашла је могућу примену у филтерима од цигарета <sup>123</sup>. Аутори ове студије квантификовали су пероксирадикал у диму од цигарете и показали да шиконин има бољу способност отклањања пероксирадикала у поређењу са стандардним антиоксидансима. Поред тога што се шиконин показао ефикасним антиоксидансом, он је и отпоран на топлоту, неиспарљив и има велики афинитет према филтерима од цигарета.

### 1.5.5. Токсичност

Пре терапеутске употребе није довољно испитати само *in vitro* и *in vivo* активности. Од виталног значаја су и аспекти као што су токсичност и метаболизам примењиваних терапеутика.

Када су у питању изохексенил нафтазарини, за сада је показано да алканин има малу токсичност када се узима орално, при чему је LD<sub>50</sub> 3 g/kg за мишеве и мање од 1 g/kg за пацове <sup>56</sup>. Токсичност није запажена ни када су мишеви храњени алканином у износу од 1 % од њихове исхране (средњи укупан унос је 3,38 g). Аутопсије спроведене након уношења алканина су показале да животиње нису имале Хајнцова телашца, као и да витални органи нису претрпели морфолошке промене. Излучивање алканина вршено је преко урина са тим да није таложен у адипоцитима. Слични резултати су добијени за шиконин и ацетилшиконин, при чему су шиконин и његови деривати значајно токсичнији за мишеве када се уносе интраперитонеално <sup>56</sup>.



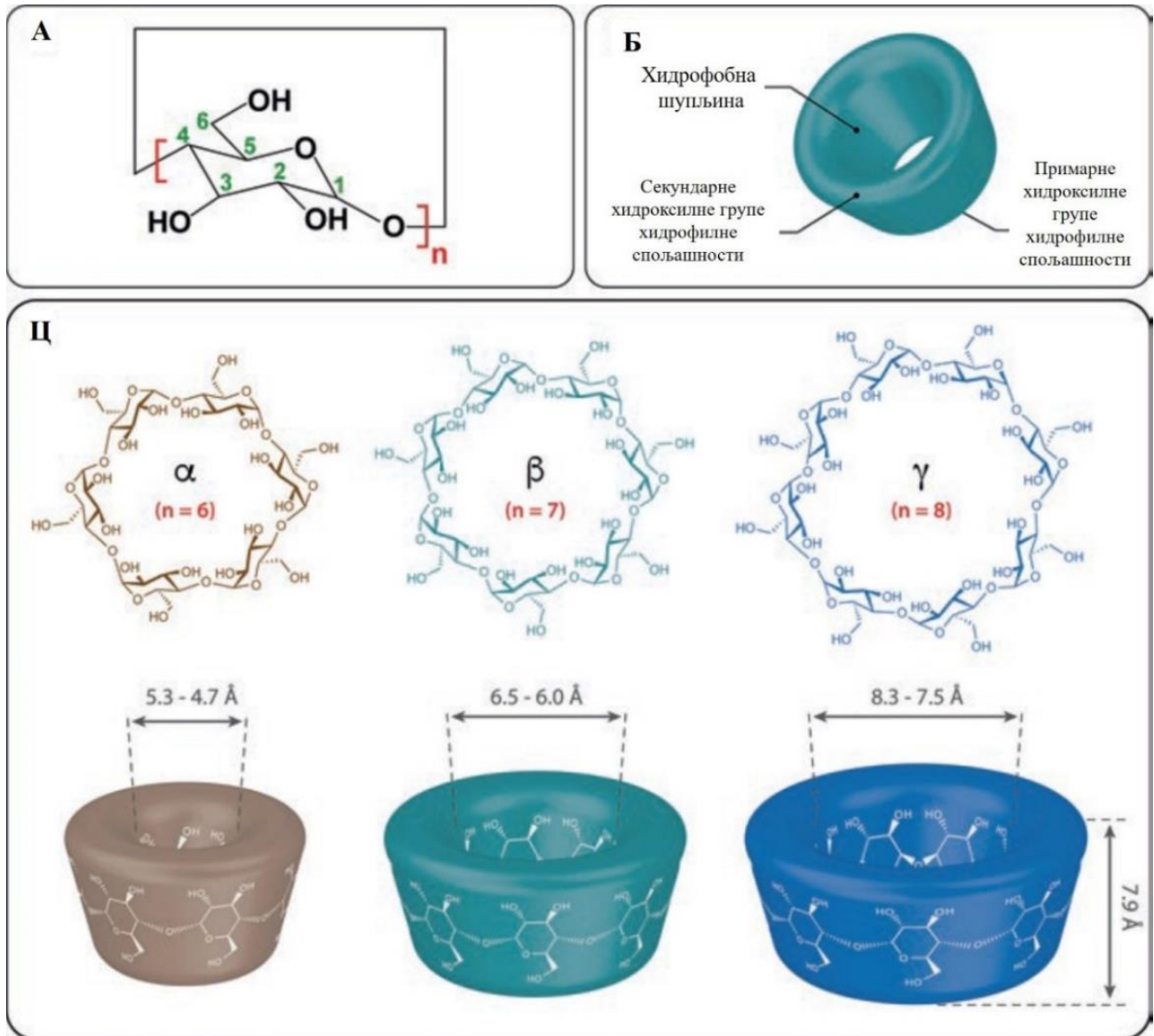
## 1.6. Циклодекстрини

Молекули циклодекстрина (CD) познати су више од 120 година, а први их је изоловао Антоин Вилиерс (Antoine Villiers) 1891. године, Ипак, тек у 1980-им су нашли прву примену у фармацеутској и прехранбеној индустрији. Први фармацеутски производ простагландин Е2/ $\beta$ -CD који је садржао циклодекстрин пласиран је у Јапану 1976. године<sup>124,125</sup>. Од тада циклодекстрини налазе примену у сврху добијања инклузионих комплекса који биокативним једињењима повећавају биорасположивост, стабилност и растворљивост.

### 1.6.1. Структура циклодекстрина

Циклодекстрини (CD) су циклични олигосахариди који се састоје од шест ( $\alpha$ -циклодекстрин), седам ( $\beta$ -циклодекстрин) и осам ( $\gamma$ -циклодекстрин)  $\alpha$ -D-глукопиранозних јединица везаних  $\alpha$ -(1-4) глукозидним везама, при чему формирају цилиндричан облик који подсећа на зарубљену купу (Слика 1.11.)<sup>125-127</sup>. У природи се могу добити бактеријским варењем скроба<sup>125,128</sup>. Ове олигосахариде одликује прилично крута хидрофобна шупљина услед присуства угљеничног скелета и етарских кисеоника из остатака глукозе, и хидрофилна спољашност која се састоји од примарних и секундарних хидроксилних група<sup>125,128</sup>. Присуство хидрофобне шупљине дозвољава инклузију других, у води слабо растворних молекула, а величина шупљине зависи од броја глукопиранозних јединица. Анализа употребом X-зрака (X-ray) показала је да су у молекулу циклодекстрина глукозидни остаци у стабилнијој конформацији столица, услед чега су све секундарне хидроксилне групе (C<sub>2</sub>-ОН и C<sub>3</sub>-ОН) лоциране на широј страни торуса молекула, а примарне (C<sub>6</sub>-ОН) на његовој ужој страни. Овакав положај хидроксилних група чини спољну страну молекула растворном у воденој средини. Од природних циклодекстрина ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD и  $\gamma$ -CD),  $\beta$ -CD има ограничену растворљивост у води услед присуства јаких интрамолекулских водоничних веза између C<sub>2</sub>-ОН и C<sub>3</sub>-ОН суседних  $\alpha$ -D-глукопиранозних јединица<sup>125,128</sup>.

Од свих природних циклодекстрина  $\beta$ -CD је највише испитиван, што је засновано на његовој ниској цени, доступности као и капацитету да формира инклузионе системе (бинарне или терцијарне) са великим бројем различитих биоактивних једињења.



Слика 1.11. Структуре циклодекстрина. Шематски приказ (А)  $\alpha$ -D-глюкопиранозних јединица, (Б) тродимензионалне структуре циклодекстрина и (Ц) хемијске структуре и димензије  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD и  $\gamma$ -CD. Преузето и модификовано из Crini G. et al. 2018<sup>125</sup>.

### 1.6.2. Примена циклодекстрина

Циклодекстрини су нашли примену у фармацеутској индустрији, различитим системима испоруке лекова, козметичи, прехранбеној и хемијској индустрији. Могу се наћи у комерцијално доступним лековима, укључујући таблете, капи за очи и масти<sup>129</sup>. Ова група олигосахарида се успешно примењује у припреми инклузионих комплекса у циљу

превазилажења одређених ограничења које поседују биоактивна једињења (превасходно мале стабилност и ниске растворљивости у води).

У прехранбеној индустрији ова група једињења се користи у циљу смањења холестерола у храни, најчешће у млечним производима. Користе се као дијететска влакна, у контроли телесне тежине и као пребиотици (јачају цревну микрофлору селективном пролиферацијом бифидобактерија)<sup>124,129</sup>. Иако су у Сједињеним Америчким Државама прихваћени као безбедни (*GRAS-Generally Recognized as Safe*) њихова токсичност зависи од начина примене. Када се употребљавају орално циклодекстрини се занемарљиво апсорбују из гастроинтестиналног тракта па практично и нису токсични (последица њихове гломазне и хидрогелне природе), али веће дозе ових олигосахарида могу довести до оштећења и дисфункције бубрега<sup>124,129</sup>. Након парентералне примене циклодекстрини се углавном (> 90 %) излучују непромењено преко урина, а остатак се елиминише другим путевима излучивања<sup>124</sup>.

### 1.6.3. Инклузиони комплекси са циклодекстринима

Формирање инклузионих комплекса типа гост-домаћин доводи до побољшаних хемијских или биолошких особина биоактивних једињења. Овакав вид инклузија се огледа у<sup>129</sup>:

- Побољшавању растворљивости у води и биорасположивости биоактивних супстанци,
- Повећавању физичко-хемијске стабилности као и рока трајања лека,
- Измени места испоруке лека или временског профила,
- Редукцији или уклањању непријатног укуса и мириса,
- Спречавању интеракција између лекова или лекова и помоћних супстанци,
- Добијању микрокристалних или аморфних прахова од лекова у течном стању.

Супрамолекуларна полимерна хемија циклодекстрина као домаћина заснива се на успостављању нековалентних интеракција (ван дер Валс-ове (Van der Waals) хидрофобне интеракције и водоничне везе) и геометријском уклапању “гост” молекула у његову липофилну шупљину<sup>125,128</sup>. Током формирања ових комплекса не долази до формирања или

прекидања ковалентних веза, а молекули у комплексу су у динамичкој равнотежи са слободним молекулима у раствору<sup>124,128</sup>. Ова равнотежа је окарактерисана константом формирања или стабилности комплекса ( $K_s$ ), а веће вредности ове константе представљају стабилнију инклузију и мању дисоцијацију<sup>125,128</sup>. Стабилност инклузије карактерише и комплементарност у величини шупљине код циклодекстрина и величине ”гост” молекула. У зависности од комплементарности величина ”гост” и ”домаћин” молекула, један ”гост” молекул може интераговати са јединим или више молекула циклодекстрина. Исто тако два или више ”гост” молекула могу интераговати са једним или више молекула циклодекстрина<sup>125</sup>. Формирање инклузионог комплекса изучавано је многим физичко-хемијским методама попут UV-Vis, NMR и флуоросцентне спектроскопије као и циркуларног дихроизма<sup>125,128</sup>.



*2. Предмет  
истраживања*

Предмет истраживања ове докторске дисертације састоји се у следећем:

- Добити екстракте корена биљке *O. visianii* применом различитих растварача, и дефинисати ефикасност растварача у циљу добијања што већег садржаја нафтохинона у екстрактима.
- Оптимизовати методу за изоловање нафтохинона из екстракта биљке *O. visianii*, изоловати нафтохиноне применом различитих хроматографских техника и одредити њихове структуре применом спектроскопских метода (UV-Vis, IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS).
- Испитати антибактеријску активност изолованих нафтохинона.
- Испитати цитотоксичну активност екстракта и изолованих нафтохинона применом МТТ теста на НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама.
- Утврдити тип ћелијске смрти, као и утицај екстракта и изолованих нафтохинона на поделу ћелијског циклуса применом проточне цитометрије на НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама.
- Испитати ефекат нафтохинона са најјачом циотоксичном активношћу на маркере оксидативног стреса код НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијских линија.
- Утврдити тип интеракција изабраних нафтохинона са биолошки важним молекулима (хумани серум албумин и дезоксирибонуклеинска киселина) применом UV-Vis и флуоресцентне спектроскопије, као и молекулске докинг симулације.
- Добијање и структурна карактеризација бинарног система изолованог нафтохинона са најбољом биолошком активношћу (ацетилшиконин) са молекулом β-циклодекстрина у циљу увећања стабилности и биолошке активности.
- Упоредити увећање и побољшање цитотоксичне активности ацетилшиконина из инклузионог система у односу на слободни ацетилшиконин применом МТТ теста и клоногеног теста.
- Упоредити утицај ацетилшиконина са утицајем његовог инклузионог система на апоптозу и поделу ћелијског циклуса.
- Одредити ефекат ацетилшиконина и његовог инклузионог система на укупан садржај реактивних кисеоничних врста применом проточне цитометрије.
- Упоредити утицај ацетилшиконина са утицајем његовог инклузионог комплекса на експресију кључних апоптотских протеина као и на инхибицију аутофагије.





*3. Експериментални  
део*

### 3.1. Растварачи и хемикалије

Петрол етар (фракција 40 °C - 60 °C), метилен-хлорид, хлороформ, етил ацетат, сирћетна киселина, ацетон, метанол, метанол HPLC чистоће,  $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -CD), диметилсулфоксид- $d_6$  (DMSO- $d_6$ ) и деутерохлороформ ( $CDCl_3$ ) су набављени од произвођача Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Јод за бојење мрља је купљен од Lachema, Czech Republic. Милер хинтонов агар (Mueller Hinton agar) набављен је од Merck, Germany. Хранљиви течни медијум (Mueller Hinton broth) набављен је од Biolife, Italy. Нитро плаво тетразолијум (NBT), никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) и 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), купљени су од SERVA, Heidelberg, Germany. Annexin V-FITC/7-AAD Kit је набављен од Beckman Coulter, USA. Стандардни антибиотици (Гентамицин (GEN), Еритромицин (ERY), Ампицилин (AMP), Тетрациклин (TETc), Имипенем (IMPe), Меропенем (MEM), Пиперацилин (PIP), Тигециклин (TGC), Ванкомицин (VAN), Норфлоксацин (NOR) и Хлорамфеникол (CHL)), цисплатина, фосфатни-пуфер (PBS), натријум нитрит, фосфорна киселина, сулфаниламид, сулфанилна киселина, сулфосалицилна киселина и 5,5'-дителиобис (2-нитробензојева киселина) (DTNB), Рибонуклеаса А (RNase A), фетални говеђи серум (FBS) и 7-Аминоацктиномицин D (7-AAD) набављени су од Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Високо полимеризовани ДНК тимуса телета (CT-DNA), хумани серум албумин (HSA, лиофилизирани прах, слободне масне киселине 0.007 %, чистоће 96 %, каталогски број. A1887), таблете фосфатног пуфера (PBS), етидијум бромид, Hoechst 33342 набављени су од Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Вода је третирана Milli-Q системом за пречишћавање, TGI Pure Water Systems, Brea, CA, USA.

Екстракција биљног материјала је рађена у балонима запремине 2000 mL произвођача Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Адсорбенти, силика гел (Silica gel 60, 70-230 mesh, Merck, Germany) и Sephadex LH20 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) су коришћени за стубну хроматографију. За препаративну танкослојну хроматографију (PTLC) је коришћен силика гел са додатком калцијум сулфата (Silica gel P/UV254 with  $CaSO_4$ , Machery-Nagel, Germany). Аналитичка танкослојна хроматографија (TLC) је рађена на оригиналним плочама произвођача Machery-Nagel, Germany (Silica gel 60, layer 0,20 mm, Alugram Sil G). Опсервација мрља на аналитичким плочама је рађена визуелно, у парама



јода, као и озрачивањем са UV зрачењем употребом UV лампе (Vilber Lourmat, Germany, модел VL-4.LC) на таласним дужинама од 365 nm и 254 nm. За развијање аналитичких TLC и препаративних TLC плоча су коришћене каде произвођача Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Стубна хроматографија је рађена на колонама произвођача Machery-Nagel, Germany (Flash chromatography glass columns; димензија 40 mm ID x 450 mm дужина и 30 mm ID x 300 mm дужина).

### 3.2. Сакупљање и припрема биљног материјала

Корен биљке *O. visianii* Clem сакупљен је у Јуну 2015. године на локалитету планине Румије (југ Црне Горе, надморска висина 650 m, 42° 06' 10'' N, 19° 11' 37'' E). Ваучер број (17130, ВЕОУ) припремљеног хербаријумског примерка је депонован у Хербаријуму Департмана за Ботанику, Факултета за Биологију, Универзитет у Београду, Србија.

Свеж биљни материјал (корен) је пажљиво испран дејонизованом водом (у сврху уклањања заостале земље и каменчића) и сушен на собној температури, у танком слоју на ваздуху, заштићен од директне светлости у временском периоду од 15 дана. Осушени корен је затим сечен на ситне делове, а затим уситњен употребом млина (величина честице је приближно 1 mm) како би се ефикасност екстракције побољшала. Овако припремљен биљни материјал чуван је у стакленим посудама на 4 °C, заштићен од светлости, до почетка екстракције.

### 3.3. Припрема растварача

Растварачи (петрол етар, метилен хлорид, хлороформ, етил ацетат, сирћетна киселина, ацетон и метанол) коришћени за добијање екстраката, односно за изоловање нафтохинонских деривата, пре употребе су обрађени (предестиловани), у циљу добијања растварача високе чистоће.

### 3.4. Добијање екстраката биљке *Onosma visianii* Clem

За потребе различитих експеримената припремани су различити екстракти корена биљке *O. visianii* Clem (Слика 3.1.).

За потребе одређивања ефикасности растварача за екстракцију, одмерено је по 5 g припремљеног биљног материјала и екстраховано принципом хладне мацерације, на собној температури у временском периоду од 24 h са по 50 mL ацетона, хлороформа, етил ацетата, метанола и смеше петрол етра:метилен хлорида = 1:1 (v/v). Овај поступак поновљен је три пута (до обезбојавања раствора изнад потопљеног биљног материјала). Добијени раствори екстраката су процеђени кроз Бихнерове (Bichner) левкове и упаравани на ротационом вакуум упаривачу на 40 °C до сува. До даље употребе сваки од екстраката је чуван у стакленим веггласима у фрижидеру на 4 °C.



Слика 3.1. Добијени екстракт корена биљке *O. visianii* Clem

Екстракција осушеног биљног материјала за изоловање нафтохинонских деривата из корена биљке *O. visianii* Clem вршена је растварачком смешом петрол етар:метилен хлорид

= 1:1 (v/v). Припремљени биљни материјал (135 g) потопљен је у 1500 mL растварачке смеше. Екстракција је вршена методом хладне мацерације, у периоду од 48 h уз повремено мешање (Слика 3.2.). Поступак се понавља 3 пута (до обезбојавања растварачке смеше). Овако добијени раствори екстракта се затим одвајају од биљног материјала цеђењем кроз Бихнеров (Bichner) левак, комбинују и упаравају на сниженом притиску применом ротационог вакуум упаривача на 40 °C до сува. Добијени тамно-црвени, вискозни екстракт (6,5 g) се затим чува до даље употребе у стакленом вегегласу, у фрижидеру на 4 °C.



Слика 3.2. Екстракција хладном мацерацијом

### 3.5. Изоловање нафтохинона из екстракта биљке *Onosma visianii*

Екстракт добијен потапањем ризома биљке *O. visianii* у смеси растврча петрол етар:метилен хлорид = 1:1 (v/v) (6 g) је коришћен за изоловање нафтохинонских деривата.

Прелиминарна идентификација фракција и проналажење најбоље смеше растварача за изоловање вршена је аналитичком танкослојном хроматографијом (аналитичка TLC). За елуирање употребљаване су смеше:

- петрол етар;
- петрол етар:етил ацетат = 9:1 (v/v);
- петрол етар:етил ацетат = 8:2 (v/v);
- петрол етар:етил ацетат = 7:3 (v/v);
- петрол етар:хлороформ:етил ацетат:сирћетна киселина = 5:2:2,5:0,5 (v/v).

Идентификација мрља рађена је визуелно, у парама јода, као и озрачивањем употребом UV лампе (Vilber Lourmat, Germany, модел VL-4.LC) на таласним дужинама од 365 nm и 254 nm.

За прелиминарно фракционисање коришћена је стубна хроматографија на стакленој колони (40 mm ID x 450 mm и 30 mm ID x 300 mm) са силика гелом као адсорбенсом.

### *3.5.1. Припрема колоне и прелиминарно фракционисање екстракта*

Силика гел (Silica gel 60, 70-230 mesh, Merck, Germany) ресуспендован је у петрол етру. На дно колоне (димензија 40 mm ID x 450 mm и 30 mm ID x 300 mm) постављена је стаклена вуна, а затим је ресуспендован силика гел наливен у колону и кондициониран.

Када је кондиционирање колоне завршено, екстракт растворен у минималној запремини петрол етра се наноси на врх колоне помоћу Пастерове пипете. Елуирање је вршено градијентним повећавањем поларности петрол етра додатком етил ацетата почевши од 1 %, до крајњег запреминског удела етил ацетата од 30 %. Елуиране фракције су сакупљане у стакленим ерленмајерима запремине од 100 mL.

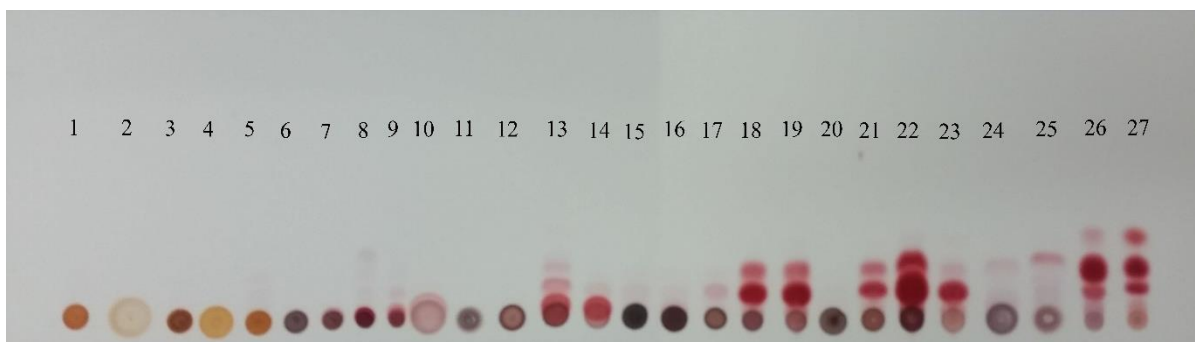


Слика 3.3. Прелиминарно фракционисање нафтохинона на колони силика гела

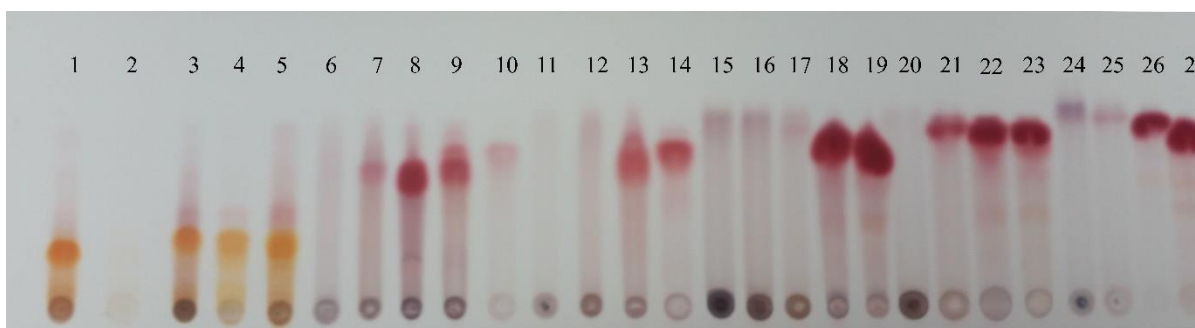
Овим прелиминарним фракционисањем (Слика 3.3.) одвојено је двадесет седам фракција (*F1 - F27*). Одвајање фракција је праћено аналитичком танкослојном хроматографијом (аналитичка TLC), а као елуенти су коришћене смеше растварача:

- петрол етар:метилен хлорид (97:3 v/v)
- петрол етар:метилен хлорид (95:5 v/v)
- петрол етар:етил ацетат (90:10 v/v)

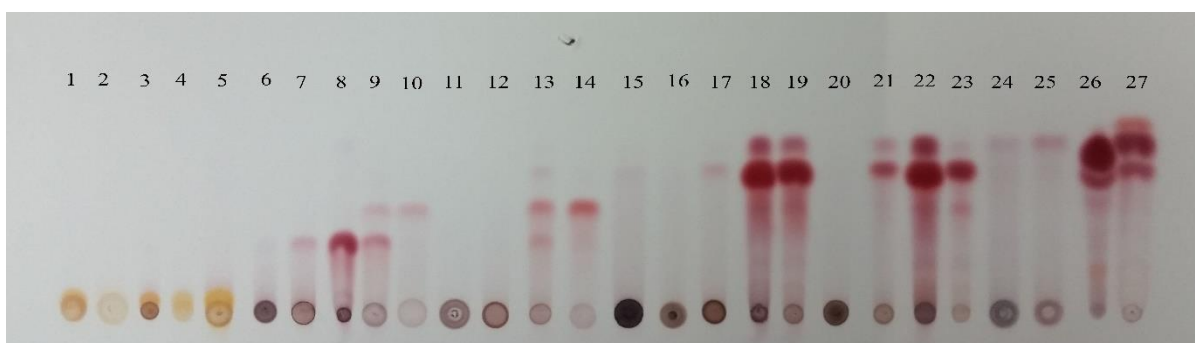
Добијени TLC хроматограми представљени су на Слика 3.4. – 3.6..



Слика 3.4. TLC хроматограм двадесетседам добијених фракција. Елуент растварачка смеша петрол етар:метилен хлорид (97:3)



Слика 3.5. TLC хроматограм двадесетседам добијених фракција. Елуент растварачка смеша петрол етар:метилен хлорид (95:5)



Слика 3.6. TLC хроматограм двадесетседам добијених фракција. Елуент растварачка смеша петрол етар:етил ацетат (90:10)

Након добијених резултата применом аналитичке танкослојне хроматографије, фракције сличних  $R_f$  вредности су спојене (*F1-11*, *F12-15*, *F16-20*, *F21-23* и *F24-27*) и упарене на ротационом вакуум упаривачу, а изоловање је даље настављено на препаративним аналитичким плочама од силика гела са додатком калцијум сулфата (Silica gel P/UV254 with CaSO<sub>4</sub>, Machery-Nagel, Germany).

### 3.5.2. Припрема препаративних плоча

На стаклене подлоге димензија 20 cm x 40 cm наливана је смеша силика гела спремљеног по прописима произвођача, при чему је дебљина слоја силика гела (адсорбенса) износила 2 mm. Наливене плоче су затим остављене преко ноћи да се суше на собној температури, након чега се сушење наставља у сушници, најпре на 100 °C у временском периоду од 2 h, при чему се на сваких 30 минута сушница отвара на кратко како би изашла настала влага. Следећи корак је жарење плоча на 120 °C у временском периоду од 20 минута без отварања сушнице, након чега се плоче остављају у сушници док се не охладе.

Фракције су на препаративне плоче наносене применом стаклених капилара. Овако припремљене плоче стављају се у стаклену каду за елуирање, при чему је у зависности од фракције коришћена различита смеша растварача као елуента (Табела 3.1.).

*Табела 3.1. Растварачи коришћени за елуирање препаративних плоча у зависности од фракције*

Фракција	Елуент
<b>F1-11</b>	петрол етар:етил ацетат (8:2 v/v)
<b>F12-15</b>	петрол етар:етил ацетат (8:2 v/v)
<b>F16-20</b>	петрол етар:етил ацетат (7:3 v/v)
<b>F21-23</b>	петрол етар:етил ацетат (7:3 v/v)
<b>F24-27</b>	петрол етар:етил ацетат (6:4 v/v)

По завршетку елуирања плоче се суше на собној температури, а раздвојене фракције се свака за себе шпатулом скидају са стаклене плоче и пребацује у ерленмајере. За потребе реекстраховања добијених фракција са адсорбенса, коришћен је етил ацетат. Након 12 h повременог мешања овако раздвојене фракције се цеде преко синтер левка, а поступак се понавља до обезбојења адсорбенса. Добијени раствор се упарава да сува на ротационом вакуум упаривачу, а добијене фракције се додатно подвргавају аналитичкој танкослојној хроматографији (као елуент се користе већ поменуте растварачке смеше).

На овај начин изолована су једињења и то **1** и **2** из фракције **F1-11**, **2** и **3** из фракције **F12-15**, из фракције **F16-20** изолована су једињења **3**, **4** и **5**, из фракције **F21-23** изоловано је једињење **5**, док је фракција **F24-27** као резултат дала једињења **6** и **7**.



Како би изолована једињења била високе чистоће, подвргнута су и семи препаративном HPLC изоловању (пречишћавању) на Agilent 1100 Series течном хроматографу (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), који се састоји од PDA детектора („Photo Diode Array detector“) ( $\lambda=520$  nm,  $\lambda=450$  nm), аутосемплера, фракционог колектора и колоне Zorbax Eclipse XDB C18 (димензија 250 x 10 mm, величина честице 5  $\mu$ m) са изократским програмом елуирања у меши воде и метанола у односу 40:60 (v/v), и запремином ињектовања од 600  $\mu$ L (2 mg/mL, метанол).

Спектрална карактеризација изолованих једињења извршена је применом UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопских метода, као и масеном спектрометријом високе резолуције, а одређена је и оптичка ротација.

Деоксишиконин **1** (5,8-дихидрокси-2-(4-метилпент-3-енил)нафтален-1,4-дион). Црвено љубичаста чврста супстанца. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{\text{max}}$  (e) 552 (3,33), 515 (3,41), 486 (3,34), 277 (3,80), 216 (4,47). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3650-3160 (OH), 3055 (=CH), 2923 (CH), 1621, 1573 и 1457 (C=C), 1222 и 1102 (C-O).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 1,60 (3H, s, H-16), 1,70 (3H, s, H-15), 2,28 (2H, m, H-11), 2,60 (2H, m, H-12a, H-12b), 5,13 (1H, t,  $J=7,1$  Hz, H-13), 6,84 (1H, s, H-3), 7,21 (2H, s, H-6 и H-7), 12,48 (1H, s, OH-5) и 12,64 (1H, s, OH-8).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 17,9 (C-16), 25,7 (C-15), 26,4 (C-12), 29,7 (C-11), 111,6 (C-9), 111,8 (C-10), 122,3 (C-13), 130,7 (C-6), 131,0 (C-7), 133,5 (C-14), 134,5 (C-3), 151,5 (C-2), 161,9 (C-5 или C-8), 162,6 (C-8 или C-5), 183,2 (C-1 или C-4) и 183,3 (C-4 или C-1). HR-ESI-MS  $m/z$   $[\text{M-H}]^- = 271,0956$  (грешка -3,340 ppm; израчунато на  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4$   $m/z$  271,0970).

Изобутирилшиконин **2** [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил изобутират]. Црвено љубичаста чврста супстанца.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  (дихлорметан,  $\text{C}=0,00121$ ) +321. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{\text{max}}$  (e) 556 (3,21), 518 (3,48), 489 (3,49), 275 (3,81), 217 (4,73). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3680-3630 (OH), 3074 и 3048 (=CH), 2965, 2925 и 2853 (CH), 1735 (C=O из  $\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1607, 1569 и 1457 (C=C), 1238, 1213, 1146 и 1116 (C-O).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 1,20 (3H, d,  $J=7,0$  Hz, H-3'), 1,22 (3H, d,  $J=7,0$  Hz, H-4'), 1,58 (3H, s, H-16), 1,69 (3H, s, H-15), 2,47 (1H, m, H-12a), 2,62 (1H, m, H-12b), 2,64 (1H, m, H-2'), 5,12 (1H, t,  $J=7,5$  Hz, H-13), 6,02 (1H, dd,  $J=7,2$  Hz,  $J=4,5$  Hz, H-11), 6,97 (1H, s, H-3), 7,18 (2H, s, H-6 и H-7), 12,42 (1H, s, OH-5) и 12,58 (1H, s, OH-8).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) 17,9 (C-16), 18,9 (C-3' и C-4'), 25,7 (C-15), 32,8 (C-12), 33,9 (C-2'), 68,8 (C-11), 111,4



(C-9), 111,8 (C-10), 117,7 (C-13), 131,3 (C-3), 132,5 (C-6), 132,8 (C-7), 135,9 (C-14), 148,5 (C-2), 166,6 (C-5 или C-8), 167,3 (C-8 или C-5), 175,7 (C-1'), 176,7 (C-1 или C-4) и 178,3 (C-4 или C-1). HR-ESI-MS  $m/z$   $[M-H]^- = 357,1320$  (грешка -3,654 ppm; израчунато на  $C_{20}H_{21}O_6$   $m/z$  357.1338).

$\alpha$ -Метилбутирилшиконин **3** [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил-2-метилбутаноат] Црвено љубичаста чврста супстанца.  $[\alpha]_D^{25}$  (дихлорметан,  $C=0,00121$ ) +221. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{max}$  (e) 557 (3,20), 518 (3,47), 489 (3,38), 275 (3,87), 216 (4,53). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3660-3622 (OH), 3041 (=CH), 2970, 2932 и 2878 (CH), 1742 (C=O из  $COOCH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1610, 1571 и 1455 (C=C), 1232, 1204, 1148 и 1113 (C-O).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ , TMS, ppm) d 0,93 (3H, t,  $J=7,3$  Hz, H-4'), 1,17 (3H, d,  $J=7,0$  Hz, H-5'), 1,53 (2H, m, H-3'), 1,59 (3H, s, H-16), 1,69 (3H, s, H-15), 2,27 (1H, m, H-2'), 2,47 (1H, m, H-12a), 2,61 (1H, m, H-12b), 5,13 (1H, t,  $J=7,0$  Hz, H-13), 6,04 (1H, dd,  $J=7,4$  Hz,  $J=4,3$  Hz, H-11), 6,98 (1H, s, H-3), 7,18 (2H, s, H-6 и H-7), 12,42 (1H, s, OH-5) и 12,58 (1H, s, OH-8).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ , TMS, ppm) d 11,4 (C-4'), 17,9 (C-16), 18,8 (C-5'), 25,7 (C-15), 26,7 (C-3'), 33,0 (C-12), 41,0 (C-2'), 69,0 (C-11), 111,6 (C-9), 111,8 (C-10), 117,8 (C-13), 131,3 (C-2), 132,6 (C-6), 132,8 (C-7), 135,9 (C-14), 148,6 (C-3), 166,9 (C-5 или C-8), 167,4 (C-8 или C-5), 175,3 (C-1'), 176,7 (C-1 или C-4), и 178,3 (C-4 или C-1). HR-ES-IMS  $m/z$   $[M-H]^- = 371,1473$  (грешка -4,405 ppm; израчунато на  $C_{21}H_{23}O_6$   $m/z$  371,1495).

Ацетилшиконин **4** [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил ацетат]. Црвено љубичаста чврста супстанца.  $[\alpha]_D^{25}$  (дихлорметан,  $C=0,00135$ ) +692. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{max}$  (e) 556 (3,21), 518 (3,48), 490 (3,41), 273 (3,89), 215 (4,53). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3650-3620 (OH), 3065 (=CH), 2921 и 2859 (CH), 1732 (C=O из  $COOCH_3$ ), 1604, 1575 и 1454 (C=C), 1236, 1209, 1114 и 1049 (C-O).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ , TMS, ppm) d 1,58 (3H, s, H-16), 1,69 (3H, s, H-15), 2,14 (3H, s, H-2'), 2,46 (1H, m, H-12a), 2,61 (1H, m, H-12b), 5,12 (1H, t,  $J=6,1$  Hz, H-13), 6,02 (1H, dd,  $J=7,4$  Hz,  $J=4,2$  Hz, H-11), 7,00 (1H, s, H-3), 7,18 (2H, s, H-6 и H-7), 12,43 (1H, s, OH-5) и 12,58 (1H, s, OH-8).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ , TMS, ppm) d 17,9 (C-16), 20,9 (C-2'), 25,7 (C-15), 32,8 (C-12), 69,5 (C-11), 111,5 (C-9), 111,8 (C-10), 117,7 (C-13), 131,4 (C-2), 132,7 (C-6), 132,9 (C-7), 136,1 (C-14), 148,1 (C-3), 166,9 (C-5 или C-8), 167,4 (C-8 или C-5), 169,6 (C-1'), 176,8 (C-1 или C-4) и 178,2 (C-4 или C-1). HR-ESI-MS  $m/z$   $[M-H]^- = 329,1004$  (грешка -4,663 ppm; израчунато на  $C_{18}H_{17}O_6$   $m/z$  329,1025).

$\beta$ -Хидроксиизовалерилшиконин **5** [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил-3-хидрокси-3-метилбутаноат]. Црвено љубичаста чврста супстанца.  $[\alpha]_D^{25}$  (дихлорметан,  $C=0,00111$ ) +91. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{\max}$  (e) 556 (3,19), 518 (3,48), 489 (3,40), 276 (3,97), 217 (4,54). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3680-3620 (OH), 3043 (=CH), 2974, 2927 и 2853 (CH), 1737 (C=O из  $\text{COOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ ), 1612, 1571 и 1455 (C=C), 1264, 1204, 1111 и 1154 (C-O).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 1,31 (6H, s, H-4', H-5'), 1,59 (3H, s, H-16), 1,69 (3H, s, H-15), 2,50 (1H, m, H-12a), 2,59 (3H, s, H-2'), 2,63 (1H, m, H-12b), 3,26 (1H, br s, C-3'-OH), 5,12 (1H, t,  $J=6,7$  Hz, H-13), 6,10 (1H, dd,  $J=7,8$  Hz,  $J=4,2$  Hz, H-11), 7,03 (1H, s, H-3), 7,18 (2H, s, H-6 и H-7), 12,41 (1H, s, OH-5) и 12,60 (1H, s, OH-8).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 18,3 (C-16), 25,7 (C-15), 29,2 (C-4'), 29,5 (C-5'), 33,1 (C-12), 46,5 (C-2'), 69,1 (C-3'), 69,8 (C-11), 111,5 (C-9), 111,8 (C-10), 117,7 (C-13), 131,3 (C-2), 133,1 (C-6), 133,3 (C-7), 136,4 (C-14), 147,5 (C-3), 168,2 (C-5 или C-8), 168,7 (C-8 или C-5), 171,6 (C-1'), 175,3 (C-1 или C-4) и 176,9 (C-4 или C-1). HR-ESI-MS  $m/z$   $[\text{M-H}]^- = 387,1419$  (грешка -4,958 ppm; израчунато на  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_7$   $m/z$  387,1444).

5,8-*O*-Диметил изобутирилшиконин **6** [(+)-1-(5,8-диметокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил изобутират]. Жута уљаста супстанца.  $[\alpha]_D^{25}$  (дихлорметан,  $C=0,00111$ ) +289. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{\max}$  (e) 452 (3,45), 259 (4,11), 215 (4,79). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3044 (=CH), 2919 и 2847 (CH), 1732 (C=O из  $\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1650 и 1457 (C=C), 1278, 1155 и 1058 (C-O).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 1,18 (3H, d,  $J=4,0$  Hz, H-3'), 1,19 (3H, d,  $J=4,0$  Hz, H-4'), 1,57 (3H, s, H-16), 1,66 (3H, s, H-15), 2,44 (1H, m, H-12a), 2,60 (1H, m, H-12b), 3,96 (6H, s, C-5-OCH<sub>3</sub>, C-8-OCH<sub>3</sub>), 5,12 (1H, t,  $J=7,5$  Hz, H-13), 5,90 (1H, dd,  $J=7,5$  Hz,  $J=4,5$  Hz, H-11), 6,65 (1H, s, H-3), 7,31 (2H, s, H-6 и H-87).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 17,9 (C-16), 18,9 (C-3' и C-4'), 20,9 (C-2'), 25,7, (C-15), 32,8 (C-12), 56,8 (C-5-OCH<sub>3</sub> или C-8-OCH<sub>3</sub>), 56,9 (C-8-OCH<sub>3</sub> или C-5-OCH<sub>3</sub>), 69,7 (C-11), 118,1 (C-13), 120,1 (C-7), 120,6 (C-9, C-10), 131,3 (C-3), 133,3 (C-6), 135,6 (C-14), 148,3 (C-2), 153,0 (C-5 или C-8), 154,0 (C-8 или C-5), 169,5 (C-1'), 183,3 (C-1 или C-4), 184,5 (C-4 или C-1). HR-ESI-MS  $m/z$   $[\text{M+H}]^+ = 387,1824$  (грешка 4,226 ppm; израчунато на  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_6$   $m/z$  387,1808).

5,8-*O*-Диметил деоксишиконин **7** (5,8-диметокси-2-(4-метилпент-3-енил)нафтален-1,4-дион). Тамно наранџаста супстанца. UV/VIS (MeOH, nm)  $\lambda_{\max}$  (e) 443 (3,33), 259 (4,21), 216 (4,75). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3054 (=CH), 2923 и 2823 (CH), 1644 и 1448 (C=C), 1278, 1207, 1046 и

1018 (C-O).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 1,58 (3H, s, H-16), 1,67 (3H, s, H-15), 2,24 (1H, m, H-12a), 2,52 (3H, m, H-11, H-12b), 3,95 (6H, s, C-5-OCH<sub>3</sub>, C-8-OCH<sub>3</sub>), 5,12 (1H, t,  $J=6,4$ , Hz, H-13), 6,60 (1H, s, H-3), 7,30 (2H, s, H-6 и H-7).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm) d 17,9 (C-16), 25,8, (C-15), 32,8 (C-12), 56,8 (C-5-OCH<sub>3</sub> или C-8-OCH<sub>3</sub>), 56,9 (C-8-OCH<sub>3</sub> или C-5-OCH<sub>3</sub>), 69,7 (C-11), 118,1 (C-13), 120,1 (C-7), 120,6 (C-9, C-10), 133,3 (C-6), 134,5 (C-3), 135,6 (C-14), 151,4 (C-2), 153,0 (C-5 или C-8), 154,0 (C-8 или C-5), 183,3 (C-1 или C-4), 184,5 (C-4 или C-1). HR-ESI-MS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 301,1450$  (грешка 3,373 ppm; израчунато на  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_4$   $m/z$  301,1439).

### 3.6. Одређивање садржаја индивидуалних компоненти нафтохинона у екстрактима

#### 3.6.1. HPLC-PDA анализа екстракта

Идентификација, као и кватификација нафтохинонски деривата у екстрактима корена (ризоме) биљке *O. visianii* Clem извршена је на Shimadzu Prominence HPLC систему који се састоји од LC-20AT пумпе, DGU-20A дегасера, CTO-20A пећи за колону, мануелног ињекторског система са петљом од 20  $\mu\text{L}$ , SPD-M20A PDA („Photo Diode Array detector“) детектора и CBM-20A Prominence 3 контролера система. За потребе анализе коришћена је Luna C18 колона (димензија 250 x 4,6 mm, величина честице 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA). Мобилна фаза састојала се од (А) тетрахидрофурана (THF), (В) ацетонитрила (MeCN) и (С) воде ( $\text{H}_2\text{O}$ ):сирћетне киселине (AcOH) = 100:1,6 (v/v). Проток мобилне фазе подешен је на 1 mL/min, док је пећница подешена на 34 °C. При анализи је коришћен градијентни програм приказан на Табела 3.2..

Табела 3.2. HPLC програм мобилне фазе за елуирање

Време (мин)	Растварачи		
	А (%)	В (%)	С (%)
	THF	MeCN	$\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}=100:1,6$ v/v
0-15	30	20	50
15-20	30	30	40
20-35	30	50	20

Употребом PDA детектора прати се апсорпција у области од 190 до 800 nm, док су хроматограми нафтохинонских деривата детектовани на 460 nm за 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин (6) и 5,8-*O*-диметил деоксишиконин (7), и на 520 nm за деоксишиконин (1), изобутирилшиконин (2),  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5).

Пет екстраката у масама од 10 mg (ацетонски, хлороформски, етил ацетатни, метанолни и петрол етарски) корена биљке *O. visianii* Clem коришћених за квантификацију, односно дефинисање садржаја активних принципа, су растворени у 1 mL метанола како би се добила концентрација од 10 mg/mL. Ови раствори екстраката су затим филтрирани преко 0,45  $\mu$ m филтера (Millipore, Billerica, MA, USA) пре HPLC анализе.

Полазни раствори изолованих једињења су направљени у метанолу (1000  $\mu$ g/mL), а потом су филтрирани преко 0,45  $\mu$ m филтера (Millipore, Billerica, MA, USA). Радни раствори изолованих једињења (100  $\mu$ g/mL у метанолу) су коришћени за дефинисање вредности ретенционих времена по горе наведеним условима елуирања, као и таласним дужинама на којима се констатују хроматографски пикови. У сврху квантитативне анализе испитиваних екстраката направљен је полазни раствор смеше свих стандардних једињења у метанолу, при чему је концентрација сваког износила 1000  $\mu$ g/mL. У циљу израде калибрационе криве од овог полазног раствора даље је направљена серија радних раствора концентрација у опсегу од 500  $\mu$ g/mL до 0,244  $\mu$ g/mL. Сви стандардни раствори су до употребе чувани на температури од 4 °C.

Концентрације стандардних једињења у испитиваним екстрактима одређене су на основу површине пика употребом једначине за линеарну регресију добијену из калибрационе криве.

Граница детекције (LOD) за однос сигнал:шум = 3 и граница квантификације (LOQ) за однос сигнал:шум = 10 за свако једињење одређена је по већ описаним хроматографским условима. Опсег линеарности је нађен на основу конструисане калибрационе криве, као функционална зависности површине пика према концентрацији.

Сви резултати (LOD, LOQ, опсег линеарности, као и концентрације индивидуалних активних принципа у испитиваним екстрактима) су дати као резултат средње вредности три узастопна ињектирања.

### 3.7. Модификована метода за изоловање нафтохинонских деривата

У циљу добијања што брже и ефикасније методе за изоловање нафтохинонских деривата модификовали смо претходно описану методу. За изоловање је коришћен исти екстракт (петрол етар:метилен хлорид = 1:1 v/v).

Екстракт је најпре фракционисан препаративном танкослојном хроматографијом на стакленим плочама које су направљене по претходно описаном поступку. Са циљем оптималног раздвајања фракција, до 200 mg екстракта наношено је на препаративне TLC плоче. За употребљену смешу растварача за елуирање (петрол етар:хлороформ:етил ацетат:сирћетна киселина (5:2:2,5:0,5 v/v) издвојено је осам фракција (**F1-F8**). Изглед препаративне плоче након елуирања представљен је на *Слика 3.7.*



*Слика 3.7. Прелиминарно раздвајање фракција екстракта корена биљке *O. visianii* препаративном танкослојном хроматографијом.*

Раздвојене фракције се шпатулом скидају, пребацују у стаклене ерленмајере или стаклене балоне запремине 200 mL, и реекстрахују смешом етил ацетат:сирћетна киселина = 9,5:0,5 v/v (*Слика 3.8.*) до обезбојавања силика гела. Применом синтер левка одваја се

силика гел од раствора, који се потом упарава на ротационом вакуум упаривачу у сврху добијања чистих фракција.



Слика 3.8. Процес реекстракције и добијања чистих фракција.

Овако добијене фракције се најпре подвргавају аналитичкој танкослојној хроматографији уз растварачку смешу петрол етар:хлороформ:етил ацетат:сирћетна киселина (5:2:2,5:0,5 v/v) за елуирање, при чему се фракције са истим Rf спајају, а затим се пречишћавају применом хроматографије на колони пуњеној Sephadex LH20 (стационарна фаза) уз раздвајање по величини молекула. Елуирање је вршено применом растварача метанола као мобилне фазе (Слика 3.9.).



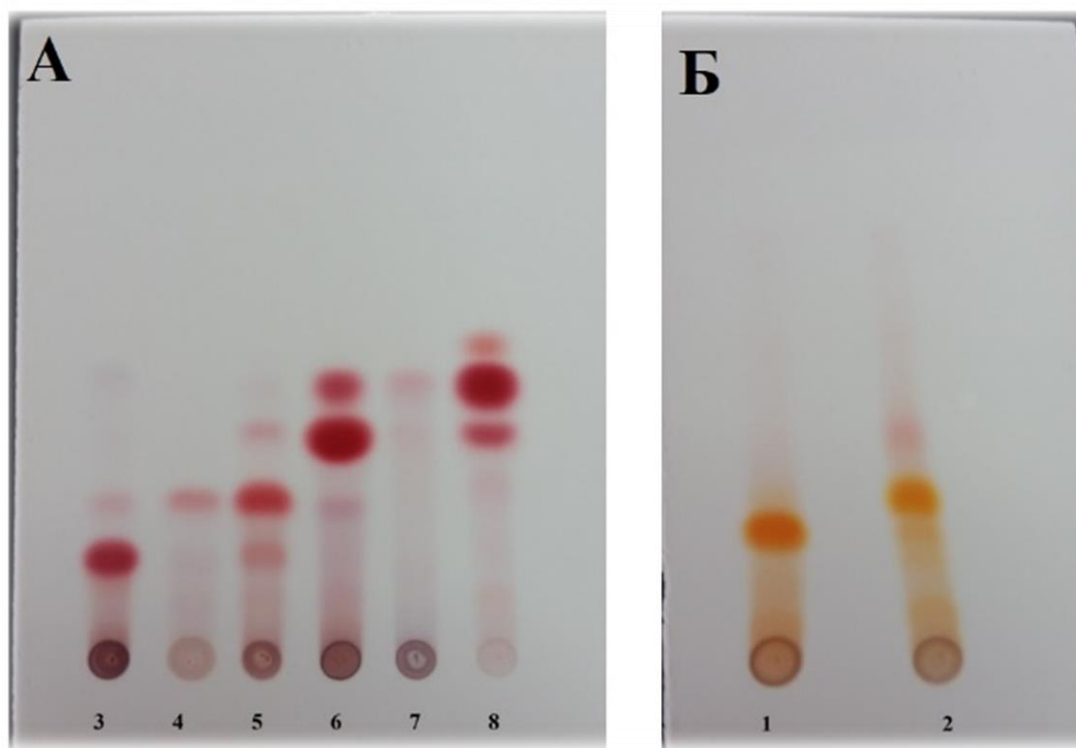
*Слика 3.9. Пречишћавање добијених фракција применом стубне хроматографије на колони пуњеној Sephadex LH20*

*Припрема колоне:*

За припремање колоне неопходно је одмерити 40 g Sephadex LH20, који се потапа са 300 mL метанола у ерленмајер запремине 1000 mL. Ова смеша се меша у временском

интервалу од 3 h, што је довољно за кондиционирање Sephadex LH20, односно за његово бубрење. Припремљени адсорбенс се затим налива у колону димензија 30 mm ID x 300 mm и оставља да преноћи. Испирање колоне након завршеног елуирања врши се у ерленмајерима запремине 2000 mL са по 700 mL метанола, а овај поступак се понавља три пута.

За елуирање појединачних фракција као елуент је употребљен метанол. Раздвајање једињења применом стубне хроматографије је праћено аналитичком танкослојном хроматографијом уз растварачку смешу петрол етар:етил ацетат (90:10 v/v) коришћену за елуирање фракција *F3-F8*, и растварачку смешу петрол етар:хлороформ:етил ацетат (40:20:40 v/v) за елуирање фракција *F1* и *F2*. На *Слика 3.10.* представљени су добијени хроматограми.



*Слика 3.10.* Аналитичка TLC плоча пречишћених једињења (*A*) смеша за елуирање фракција *F3-F8* петрол етар:етил ацетат (90:10); (*B*) смеша за елуирање фракција *F1* и *F2* петрол етар:хлороформ:етил ацетат (40:20:40)

У циљу добијања једињења високе чистоће, пречишћене фракције су подвргнуте семипрепаративној HPLC на Zorbax Eclipse XDB C18 (димензија 250 x 10 mm, величина



честице 5  $\mu\text{m}$ ) са изократским програмом елуирања у смеши воде и метанола у односу 40:60 v/v.

Спектрална карактеризација изолованих једињења извршена је применом UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопских метода, а добијени спектри су такође упоређени са спектрима претходно изолованих једињења која су у овом случају имала улогу стандарда.

### **3.8. Добијање инклузионог комплекса (бинарног система) ацетилшиконина са $\beta$ -циклодекстрином**

Модификованом методом копреципитације добијен је инклузиони комплекс ацетилшиконина (**4**) са  $\beta$ -циклодекстрином (**4**/ $\beta$ -CD) <sup>130</sup>. У балон са округлим дном растворен је  $\beta$ -CD (103,1 mg,  $9,08 \times 10^{-5}$  mol) у 30 mL дејонизоване воде уз константно мешање у временском периоду од 1 h на собној температури. Када је растварање завршено, у балон се сукцесивно додаје 20 mL метанолског раствора ацетилшиконина (**4**) (30 mg,  $9,08 \times 10^{-5}$  mol). Ова смеша подвргнута је интензивном мешању на 60 °C у периоду од 3 h, а затим још 6 h на собној температури. Након формирања инклузионог система метанол је упарен на вакуум упаривачу под сниженим притиском. Добијени љубичасти талог инклузионог комплекса **4**/ $\beta$ -CD се одваја филтрирањем и суши на 50 °C у временском периоду од 24 h.

### **3.9. Структурна карактеризација изолованих нафтохинона и инклузионог комплекса ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин**

#### *Елементална микроанализа*

Микроанализа за атоме C и H урађена је на Carlo Erba 1106 microanalyser-у.

#### *UV-Vis карактеризација*

Електронски апсорпциони спектри снимани су на Agilent Cary 300 UV-Vis спектрофотометру (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) у области од 200-800 nm. Добијени експериментални резултати обрађивани су у Microsoft Office Excel 2010 софтверском пакету.

*IR карактеризација*

Инфрацрвени спектри снимљени су у форми KBr пилула на Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR спектрометру ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) и Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer Spectrum One ( $\nu\text{ cm}^{-1}$ ).

 *$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR карактеризација*

У сврху снимања NMR спектра коришћени су Bruker Avance III 500 spectrometer ( $^1\text{H}$  NMR на  $500,26\text{ MHz}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR на  $125,80\text{ MHz}$ ) и Varian Gemini 200 spectrometer ( $^1\text{H}$  NMR на  $200\text{ MHz}$ ), уз примену тетраметилсилана (TMS) као интерног стандарда. За снимање су коришћене кивете пречника  $5\text{ mm}$  и деутеро растварачи  $\text{CDCl}_3$  и  $\text{DMSO-d}_6$ . Положаји сигнала су дати у бездимензионим јединицама хемијског померања ( $\delta$ , ppm), а константе купловања ( $J$ ) дате су у Hz.

*MS карактеризација*

Масени спектри ниске резолуције снимани су на квадруполном масеном спектрометру Agilent 5973 MSD (Santa Clara, CA, USA), док су спектри високе резолуције добијени применом масеног спектрометра на бази времена прелетања Agilent 6210 Time of Flight (TOF) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) и јонска замка-квадрупол-орбитрап (LTQ) хибридног масеног спектрометра са електрон спреј јонизационим системом (linear-trap quadrupole orbitrap hybrid mass spectrometer (HESI-II, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany).

*Карактеризација оптичке активности*

Вредности  $[\alpha]_D$  су измерене на Perkin Elmer 341 полариметру. За једињења **2-6** вредности  $[\alpha]_D$  су измерене из дихлорметанских раствора.

*XRPD (X-ray powder diffractometry) карактеризација*

Рендгенска дифрактометрија праха (XRPD) изведена је на Rigaku Smartlab аутоматизованом вишенаменском дифрактометру X-зрака у  $\theta$ - $\theta$  геометрији (узорак се налази у хоризонталном положају) парафокусирајући Bragg-Brentano геометрију употребом D/teX Ultra 250 детектора трака у 1D нормалном моду са  $\text{CuK}\alpha_{1,2}$  извором зрачења ( $U = 40$

kV and  $I = 30$  mA). XRPD траке су снимљене у  $3-20^\circ 2\theta$ , са кораком од  $0,01^\circ$ , и временском константом од  $0,5^\circ/\text{min}$  и обрађене одговарајућим софтверским пакетом Rigaku PDXL 2.0 software.

### SEM (Scanning electron microscopy) карактеризација

Величина и морфологија честица инклузионог комплекса  $4/\beta$ -CD одређена је применом JEOL JSM-6610 електронског микроскопа. Непосредно пре анализе, узорак бинарног система је постављен на проводљив премаз и његова површина је прекривена танким слојем злата. Напон убрзања је био 20 kV.

## 3.10. Одређивање фазне растворљивости

Одређивање фазне растворљивости је изведено у води као растварачу на собној температури при  $\text{pH}=7$ <sup>131</sup>. У 10 mL дејонизоване воде додат је у вишку ацетилшиконин **4** (20 mg), док је концентрација  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) варира у опсегу концентрација од 0 mol/L до 0,012 mol/L. Сваки од овако добијених раствора је мешан у временском интервалу од 48 h на собној температури ( $25^\circ\text{C}$ ) и без присуства светлости. Након постизања равнотеже сви раствори су филтрирани кроз  $0,45\ \mu\text{m}$  мембранске филтере како би се уклонио вишак једињења **4**. Апсорбанца једињења **4** праћена је UV-Vis спектроскопијом на 520 nm. Концентрација нафтохинона **4** у испитиваним растворима израчуната је применом UV-Vis спектроскопије из претходно добијене стандардне криве слободног нафтохинона **4** (0,001 mol/L - 0,012 mol/L). Експериментални резултат је израчунат као средња вредност три мерења. Одговарајућа константа формирања инклузионог комплекса ( $K_s$ )  $4/\beta$ -CD израчуната је из нагиба линеарне праве дијаграма фазне растворљивости према једначини:

$$K_s = \text{Нагиб}/S_0(1 - \text{Нагиб}) (I)$$

где је  $S_0$ - растворљивост **4** у одсуству  $4/\beta$ -CD.

### 3.11. Тестови цитотоксичности

#### 3.11.1. Коришћене ћелијске линије

За одређивање цитотоксичне активности екстраката, изолованих једињења и енкапсулираног ацетилшиконина у  $\beta$ -циклодекстрину коришћене су хумана ћелијска линија канцера дебелог црева (HCT-116 - „human colon cancer cell“) и хумана ћелијска линија аденокарцинома дојке (MDA-MB-231 - „human breast carcinoma cell“). Тест ћелијске линије су купљене од American Type Culture Collection (ATCC, USA). Обе ћелијске линије су гајене у DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Austria) подлози са 2 mM глутамином (Sigma, MO, SAD), 10 % топлотно инактивираним феталним говеђим серумом (FBS, PAA laboratories, Аустрија) и 1 % Pen/Strep (PAA laboratories, Austria) на 37 °C при оптималној влажности, у атмосфери засићеној са 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.11.2. Припрема ћелија за тестирање

Ћелије се чувају у криовијалама у течном азоту на -196 °C што дозвољава њихово одржавање у живом стању, смањује проблеме попут унакрсне контаминације ћелијским линијама и генетички дрифт. Једна криовијала запремине 1 mL са залеђеним ћелијама довољна је за фласк од 25 cm<sup>2</sup>, што задовољава потребе експеримента. Ћелије се одмрзавају у инкубатору на 37 °C. Након одмрзавања ћелије је потребно пребацити у 4 mL комплетног медијума и центрифугирати 10 минута, затим се медијум аспирира, а талог ћелија се ресуспендује у нових 5 mL медијума и ћелије се засеју у фласк Т-25.

#### 3.11.3. Трипсинизација и пасажирање ћелија

Ћелије одмрзнуте и засејане адхериране су за дно фласка. Како би их одвојили од дна фласка пре сваког пасажирања, или самог засејавања ћелија неопходно их је трипсинизирати. Трипсинизација подразумева употребу трипсина као субстрата за

одлепљивање ћелија. Процес пасажирања представља пребацивање мањег броја ћелија из флашка у коме расту у нови флашак са новом хранљивом подлогом<sup>132</sup>. Процес пасажирања се врши одмах након трипсинизације.

Принцип:

Из флашка у којем су засејане ћелије најпре је неопходно одстранити хранљиву подлогу. Након тога се ћелије испирају са 0,25 % трипсином (1 mL уколико се ради о мањем флашку или 3 mL ако се ради о већем флашку). По додатку трипсина потребно је неколико минута како би се ћелије одлепиле од подлоге. Одлепљене ћелије се пребацују у други флашак у коме се налази медијум (хранљива подлога у којој се ћелије размножавају и расту). На овај начин се и зауставља процес трипсинизације. Како би се створили услови да се ћелије дужи временски период чувају у лабораторијским условима неопходно је пасажирање. Пасажирање се врши тако што се одлепљене ћелије ресуспендују у 5 mL хранљиве подлоге и пренесу у други флашак. У зависности од величине флашка потребне су различите количине медијума, па тако за чување ћелија у малом флашку додаје се до 5 mL медијума, односно 12 mL за чување ћелија у већем флашку. Како би са сигурношћу знали да су ћелије доспеле у нови флашак неопходно је проверити помоћу микроскопа њихово присуство.

#### *3.11.4. Одређивање броја вијабилних ћелија*

У тренутку када ћелије достигну жељени раст и буду спремне за тестирање неопходно је одредити број вијабилних (живих) ћелија које су потребне за извођење експеримента. Број оваквих ћелија се одређује помоћу трипан плавог, реагенса који мртве ћелије боји у плаво, а живе ћелије остају необојене. Промена боје се уочава помоћу микроскопа.

Принцип:

За потребе овог теста неопходно је по већ објашњеном принципу одлепити ћелије од површине флашка и одатле узети 10  $\mu$ L ћелијске суспензије која се у односу 1:1 меша са

трипан плавим. Ова смеша се у запремини до 10  $\mu\text{L}$  налива у хемоцитометар, а бројање ћелија се одвија под микроскопом. Ћелије се броје у два дијагонална квадрата површине 0,0003  $\text{mm}^2$ . Број вијабилних ћелија се израчунава по следећој једначини при чему је битно узети у обзир димензије комора и разблажење :

$$* \text{СВ броја ћелија из оба квадрата} \times \text{разблажење} \times 2 = \text{Број ћелија /mL (2)}$$

\*СВ-средња вредност

На овај начин се одређује укупан број расположивих ћелија у 1 mL.

### 3.11.5. МТТ тест за испитивање цитотоксичности

За одређивање цитотоксичности екстраката, изолованих једињења (I-7) и енкапсулираног ацетилшиконина у  $\beta$ -циклодекстрину коришћен је колориметријски МТТ тест којим се одређује инхибиција раста ћелија, односно проценат преживелих ћелија.

#### Принцип

3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) је жуто обојена тетразолијумова со која се при реакцији са ензимом живих ћелија, митохондријалном дехидрогеназом, редукује до љубичасто обојеног формазана. Ова реакција се може квантификовати спектрофотометријски на одређеној таласној дужини (између 500 nm и 600 nm, оптимално на 550 nm) <sup>133</sup>.

#### 3.11.5.1. Припрема радних раствора

Основни раствори ацетонског, етилацетатног, хлороформског, петрол етарског и метанолног екстраката биљке *O. visianii* Clem прављени су растварањем 10 mg сваког од екстракта у 10  $\mu\text{L}$  DMSO-а након чега је додато 990  $\mu\text{L}$  DMEM-а у сваки од раствора, тако да је крајња концентрација екстраката у раствору била 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Од овог раствора прављена је серија радних раствора у концентрацијама од 500, 150, 50, 15, 5 и 1,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Основни раствори изолованих једињења **I-7** направљени су растварањем у DMSO-у до концентрације од 200 µg/mL. Сукцесивним разблаживањем основног раствора добијена је серија радних раствора изолованих једињења **I-7** у концентрацијама 100, 30, 10, 3, 1, и 0,3 µg/mL.

Основни раствори концентрације 500 µg/mL **4**, **4/β-CD** и β-циклодектрина (β-CD) припремљени су растварањем у малој количини DMSO-а и затим разблажени DMEM-ом. Раствор **4/β-CD** припремљен је у односу на количину ацетилшиконина у комплексу. Серија радних раствора концентрације 1, 3, 10, 30 и 100 µg/mL направљени су разблаживањем основних раствора.

Сви радни раствори су филтрирани кроз 0,22 µm милипоре мембранске филтере, а направљени су разблаживањем основног раствора DMEM-ом тако да концентрација DMSO-а не буде већа од 0,5 % (v/v).

#### 3.11.5.2. Третман ћелија

НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијске линије засејане су у микротитар плоче са 96 бунарића у запремини од 100 µL и остављене преко ноћи да се инкубирају на 37 °C са 5 % CO<sub>2</sub> како би адхерирале за подлогу. Концентрација засејаних ћелија износила је 5 x 10<sup>4</sup> ћелија по бунару за тест са екстрактима и изолованим једињењима, и 3 x 10<sup>3</sup> ћелија по бунару за поређење цитотоксичног ефекта инклузионог комплекса **4/β-CD**, **4** и β-CD. Третман ћелија вршен је 24 h након инкубације при чему се медијум у бунарићима замени медијумом који садржи различите концентрације екстракта, изолованих једињења **I-7**, као и **4**, **4/β-CD** и β-CD (у запремини од 100 µL). Контролним ћелијама додаје се само медијум. Као позитивна контрола коришћен је комплекс цисплатина у концентрацијама 100, 30, 10, 3, 1, и 0,3 µg/mL, који се користи у терапији канцера.

Овако третиране ћелије затим су инкубиране 24 h, 48 h and 72 h на 37 °C у атмосфери са 5 % CO<sub>2</sub>. Након инкубирања из бунарића са контролним и третираним ћелијама уклања се медијум и додаје се 100 µL МТТ-а (0,5 mg/mL PBS). Након инкубације од 4 h на 37 °C, раствор МТТ-а се уклања и додаје се 150 µL DMSO-а како би се растворили кристали формазана. Апсорбанца се мери на читачу за микротитар плоче (Zenyth 3100, Anthos Labtec

Instruments GmbH, Austria) на 595 nm <sup>133</sup>. Вредности добијене читавањем апсорбанце одговарају броју живих ћелија, а њихов проценат се израчунава по следећој једначини:

$$(\text{апсорбанца третираних ћелија}) / (\text{апсорбанца контролних ћелија}) \times 100 \quad (3)$$

### 3.11.6. Статистичка обрада резултата

Сви експерименти су рађени у трипликату, а резултати су изражени као средња вредност три независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка (SE). Резултати су обрађени у програму за статистичку обраду резултата SPSS (Chicago, IL) (SPSS for Windows, ver. 17, 2008). Резултати изражени у облику IC<sub>50</sub> вредности (концентрације третмана које убијају 50 % ћелија) за екстракте и изолована једињења прерачунате су употребом Microsoft Office Excel бесплатног додатка (ed50v10.xls.) за линеарну регресију (преузетог са <http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/drug/data/>). За потребе израчунавања IC<sub>50</sub> вредности за ацетилшиконин (**4**) и његов инклузиони комплекс са  $\beta$ -циклодектрином (**4**/ $\beta$ -CD) коришћена је „Trend“ функција у Microsoft Excel 2010.

### 3.11.7. Клоногени тест

Клоногени тест, или тест формирања колонија заснива се на способности једне ћелије да прерасте у колонију, при чему се једна колонија састоји од најмање 50 ћелија. Овај тест има улогу у одређивању ефикасности цитотоксичних агенаса <sup>134</sup>.

#### Принцип

Ћелијске линије HTC-116 (300 ћелија по бунару) и MDA-MB-231 (100 ћелија по бунару) засејане су у плоче са 6 бунарића и остављене преко ноћи. Ћелије су затим третиране са **4** и **4**/ $\beta$ -CD у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  и остављене да формирају колоније у временском периоду од 15 дана на 37 °C са 5 % CO<sub>2</sub> са редовним додавањем медијума сваког четвртог дана. По истеку времена уклоњен је медијум, а колоније су испране PBS-ом, фиксирани ледено хладним метанолом 15 минута и обојене



свеже припремљеним 10 %-им раствором Гимзе, фотографисане и бројане под микроскопом. Фракција преживљавања (SF) која представља фракцију преживелих ћелија за сваку ћелијску линију и третман израчуната је према формули:

$$SF = N_1/N \times PE \quad (4)$$

где је  $N_1$  број формираних колонија након третмана,  $N$  број засејаних ћелија а PE (Plating efficiency) однос између броја формираних колонија и броја засејаних ћелија у нетретираној контроли.

## 3.12. Проточна цитометрија

### 3.12.1. Одређивање типа ћелијске смрти употребом Annexin V-FITC/7-AAD кита

Апоптоза представља генетски програмирану ћелијску смрт. Од некрозе се може разликовати карактеристичним како биохемијским, тако и морфолошким променама. Код свих нормалних живих ћелија фосфатидилсерин се налази на унутрашњој страни мембране ћелије. У раном процесу апоптозе долази до миграције фосфатидилсерина на спољашњу страну мембране и ова појава је маркер за препознавање апоптотичних ћелија. Када дође до миграције, фосфатидилсерин постаје доступан за везивање за хумани антикоагулант Annexin V-FITC, док 7-AAD (7-амино-актиномицин D) има способност везивања за ћелијску ДНК у оним ћелијама код којих је ћелијска мембрана потпуно оштећена<sup>135</sup>.

#### Принцип

Ћелијске линије HCT-116 и MDA-MB-231 засејане су у микротитар плоче са 6 бунарића, и третиране су ацетонским, хлороформским и етил ацетатним екстрактом у концентрацијама које одговарају претходно дефинисаним  $IC_{50}$  вредностима, односно изолованим нафтохинонима у концентрацији од 100  $\mu\text{g/mL}$  за једињења **1-5** и 500  $\mu\text{g/mL}$  за једињења **6** и **7**. Нетретиране ћелије коришћене су као контрола. Након инкубације од 48 h

у условима апсолутне влажности на 35 °C у 5 % CO<sub>2</sub> ћелије су сакупљене, опране у PBS-у и ресуспендоване у 500 µL ледено хладног пуфера (Binding buffer). Затим су суспензије ћелија (1 x 10<sup>5</sup>) обојене Annexin V-FITC/7-AAD китом (Beckman Coulter, USA) према упутствима произвођача, односно 10 µL Annexin V-FITC и 20 µL 7-AAD додато је у суспензије. Након петнаест минута инкубације без присуства светлости, 400 µL ледено хладног пуфера је додато у сваки узорак. Овако добијени узорци су затим анализирани на Cytomics FC500 проточном цитометру (Beckman Coulter, USA). Процент вијабилних (AnnVneg/7AADneg), рано апоптотичних (AnnVpos/7AADneg), касно апоптотичних (AnnVpos/7-AADpos) и некротичних (AnnVneg/7-AADpos) ћелија одређен је коришћењем Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>), а добијени резултати су представљени као dot plot-ови и графици израђени у Microsoft Excel 2010.

### 3.12.2. Анализа ћелијског циклуса

Како би одредили процентуалну заступљеност ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса коришћена је метода бојења пропидијум-јодидом (PI)<sup>136,137</sup>. Пропидијум-јодид је флуоресцентна боја која има способност интеркалације у молекуле нуклеинских киселина. На основу промене интензитета флуоресценције PI може се одредити количина ДНК у анализираним ћелијама. Ћелије са диплоидним садржајем ДНК (2n) су оне које се налазе у G0/G1 фази, док су хиподиплоидне ћелије (<2n) оне у процесу апоптозе. Ћелије које имају већи садржај ДНК од диплоидних (2n-4n) представљају ћелије у S фази, а ћелије које се налазе у G2/M фази имају дупло већи садржај ДНК од диплоидних (4n).

#### Принцип

Коришћене ћелијске линије НСТ-116 и MDA-MB-231 третиране су ацетонским, хлороформским, етил ацетатним екстрактом, једињењем **4** и инклузионим комплексом **4/β-CD** у концентрацијама које одговарају IC<sub>50</sub> вредностима и изолованим нафтохинонима у концентрацији од 100 µg/mL за једињења **1-5** и 500 µg/mL за једињења **6** и **7**. Ћелије третиране свежим медијумом коришћене су као контрола. Након инкубације од 48 h у условима апсолутне влажности на 35 °C у 5 % CO<sub>2</sub> ћелије су сакупљене, опране у PBS-у, па затим фиксиране у 70 % хладном етанолу преко ноћи на + 4 °C<sup>138</sup>. Након фиксације ћелије

су ресуспендоване у 1 mL PBS-а са RNA-зом А (500 µg/mL) и инкубиране 30 минута на 37 °C. Затим се изводи бојење додатком 5 µL PI (10 mg PI/mL PBS) након чега се ћелије опет икубирају у временском интервалу од 15 минута без присуства светлости и одмах анализирају на Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA) проточном цитометру. Садржај ДНК анализиран је употребом Flowing Software-а, и FlowJo Software (FlowJo LLC, Oregon, USA), а дистрибуција ћелијског циклуса је приказана хистограмима и графицима израђеним у Microsoft Excel 2010.

### *3.12.3. Акридин-оранж/етидијум-бромид (АО/ЕВ) тест флуоресцентне микроскопије*

Двоструко бојење флуоресцентним бојама АО/ЕВ је метода која се користи за одређивање типа ћелијске смрти. Нетретиране, контролне НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелије, као и ћелије третиране ацетонским, хлороформским, етил ацетатним екстрактом (у концентрацијама које су аналогне IC<sub>50</sub> вредностима) обојене су са 1,0 µL смеше боја АО/ЕВ (100,0 mg/mL етидијум бромида и 100,0 mg/mL акридин оранжа). Морфологија ћелија је анализирана флуоресцентним микроскопом (Leica DM1000, Germany) са увећањем од 400x. Фотографије су снимљене са Canon PC 1089 дигиталним апаратом.

### *3.12.4. Одређивање укупног садржаја реактивних кисеоничних врста (ROS есеј)*

У циљу одређивања укупног садржаја реактивних кисеоничних врста, ћелије су бојене дихлорофлуоресцеин диацетатом (DCFDA) употребом DCFDA/H<sub>2</sub>DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam, USA). DCFDA представља нефлуоресцентни молекул који веома лако дифундује кроз ћелијску мембрану након чега хидролизује до H<sub>2</sub>DCFDA, који затим у присуству реактивних кисеоничних врста прелази у флуоресцентни дериват дихлорофлуоресцеина (DCF)<sup>139,140</sup>.

### Принцип

Ћелијске линије HCT-116 и MDA-MB-231 култивисане су у флашковима од 25 cm<sup>2</sup>, суспендоване у одговарајућим епруветама (1 x 10<sup>5</sup>/mL), центрифугиране и ресуспендоване у 100 µL 20 µM DCFDA, а потом и инкубиране у временском периоду од 30 минута на 37 °C. Након тога ћелије су третиране са 100 µL **4** и **4**/β-CD у концентрацијама које одговарају IC<sub>50</sub> вредностима, DMEM-ом и 200 µM ТВНР (позитивна контрола), и инкубиране у периоду од 2 h, 4 h и 6 h. По завршетку инкубације у сваку епрувету додато је 200 µL PBS-а, и узорци су одмах анализирани на проточном цитометру Cytomic F500. Подаци добијени мерењем најмање 10,000 догађаја по узорку приказани су помоћу хистограма и анализирани коришћењем програма Flowing Software. Промене у садржају реактивних кисеоничних врста после третмана приказане су као проценат у односу на садржај ROS у нетретираним контролним ћелијама.

### *3.12.5. Детекција и квантификација кисело-везикуларних органела (AVOs)*

За детекцију киселих везикула (AVOs - acido-vesicular organelles, *енг.*) коришћена је ћелијски пермеабилна флуоресцентна боја акридин оранж која при промени киселости средине мења флуоресценцију. У контакту са цитоплазмом и једром, у условима неутралног рН, ова боја емитује зелену флуоресценцију, док се у киселим везикулама попут лизозома и фаголизозома протонује и емитује црвену флуоресценцију. Мерењем интензитета емитоване флуоресценције могуће је пратити формирање киселих везикула (AVOs).

### Принцип

За детекцију аутофагије ћелије су након третмана покупљене, опране PBS-ом и обојене акридин оранжом (1 µg/mL). Након 15 минута боја је уклоњена, ћелије су опране, ресуспендоване у 300 µL PBS-а и анализирани на проточном цитометру. Подаци су анализирани коришћењем програма Flowing Software, а индукција аутофагије је квантификована као проценат ћелија које емитују и црвену и зелену флуоресценцију.

### 3.12.6. Анализа протеина апоптозе и аутофагије

#### Принцип:

Након третмана ћелије су покупљене, опране PBS-ом и затим фиксиране и пермеабелизоване коришћењем Fixation and Permeabilization Kit-a (eBioscience). Са циљем да се потврди апоптоза, ћелије су инкубирани са примарним анти-Bcl-2, анти-Bax (Santa Cruz Biotech Inc) или анти-активна каспаза-3 антителом (Cell signaling Technology) током 20 минута на собној температури. Након тога ћелије су опране PBS-ом да би се уклонила невезана антитела, и инкубирани са секундарним антителом, коњугованим са FITC флуорохромом (Abcam, USA), током 20 минута на собној температури у мраку. После прања ћелије су ресуспендоване у PBS-у и анализирани на проточном цитометру. За детекцију аутофагије ћелије су инкубирани са анти-p62 моноклонским антителом коњугованим са FITC флуорохромом (Abcam, USA). Нивои Bcl-2, Bax и p62 протеина, изражени као средњи интензитет флуоресценције (mean fluorescence index, MFI), као и проценат ћелија које садрже активiranу каспазу-3, одређени су коришћењем Flowing Software-a, а резултати су приказани хистограмски.

## 3.13. Испитивање редокс статуса

### 3.13.1. Припрема радних раствора

Основни раствори изолованих једињења **3**, **4** и **5** направљени су растварањем 10 mg сваког од нафтохинона у 10  $\mu$ L DMSO-а, након чега је додато 990  $\mu$ L DMEM-а у сваки од раствора тако да је крајња концентрација сваког од испитиваних нафтохинона у растворима била 1000  $\mu$ g/mL. Сви раствори су затим филтрирани кроз 0,22  $\mu$ m милипоре мембранске филтере. Од овог раствора прављена је серија радних раствора у концентрацијама од 100, 50, 10, 1, 0,1  $\mu$ g/mL разблаживањем са DMEM-ом, како финална концентрација DMSO-а у ћелијским културама не би била већа од 0,5 % (v/v).

### 3.13.2. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) NBT тестом

Спектрофотометријска метода за одређивање концентрације  $O_2^{\cdot-}$  заснива се на редукцији нитроблу-тетразолијума (NBT) до нитроблу-формаза у присуству супероксид анјон радикала. Овај тест се користи за мерење количине продукованог  $O_2^{\cdot-}$  у биолошким системима <sup>141</sup>.

#### Принцип:

Коришћене ћелијске линије HCT-116 и MDA-MB-231 третиране су радним растворима једињења **3**, **4** и **5** у временском периоду од 24 h, 48 h и 72 h. Као контрола коришћене су нетретиране ћелије. Након сваког од временских интервала од третмана, у сваки бунарић додавано је 20  $\mu$ L NBT-а у концентрацији 5 mg/mL, а ћелије су потом инкубиране 45 минута на 37 °C у 5 %  $CO_2$ . У сврху квантификације бојене реакције, формазан из ћелија је растворен у 2M калијум хидроксиду, а добијена боја мерена је колориметријски на микротитар читачу плоча, при чему је праћена таласна дужина од 570 nm. Резултати су изражени као nmol NBT/mL употребом једначине:

$$\text{nmol NBT/mL} = A/0,015 \times V_{\text{cuv}} / V_{\text{ex}} \quad (5)$$

где је А-апсорбанца, 0,015 моларни екстинкциони коефицијент за моноформаза ( $15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{cuv}}$  - укупна запремина раствора у бунарићу = 120  $\mu$ L;  $V_{\text{ex}}$  – запремина ћелија са третманом = 100  $\mu$ L. Експеримент је понављан три пута.

### 3.13.3. Одређивање концентрације нитрита ( $NO_2^-$ )

За одређивање концентрације нитрита коришћена је спектрофотометријска метода по Griess-у <sup>142</sup>. Ова метода се заснива на диазотизационој реакцији у којој сулфаниламидна киселина и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагујући са нитритима дају

пурпурно обојено стабилно азотно једињење. На таласној дужини од 550 nm мери се интензитет настале пурпурне боје који је директно пропорционалан концентрацији нитрита.

Принцип:

Коришћене ћелијске линије HCT-116 и MDA-MB-231 третиране су радним растворима једињења 3, 4 и 5 у временском периоду од 24 h, 48 h и 72 h. Као контрола коришћене су нетретиране ћелије. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је након сваког од периода инкубације ћелија са третманима центрифугирана 10 минута на 300 rpm како би се одвојио супернатант. Од основног раствор нитрита (100 mM) направљена је серија разблажених раствора концентрације (од 100  $\mu\text{M}$  до 1,6  $\mu\text{M}$ ) за одређивање стандардне криве. У све бунариће је додато 50  $\mu\text{L}$  супернатанта, а затим је додато по 50  $\mu\text{L}$  сулфаниламидног реагенса. Овако припремљене микротитар плоче су инкубирани 10 минута на собној температури без присуства светлости, након чега је додато по 50  $\mu\text{L}$  N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагенса у све бунариће. Интензитет пурпурне боје се мери на микротитар читачу плоча при чему је праћена таласна дужина од 550 nm, а концентрација нитрита изражена као  $\mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија/mL се рачуна из поменуте стандардне криве за нитрите по једначини:

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{mL} = A/F \times R \quad (6)$$

где је А – апсорбанца, F – нагиб стандардне криве и R – утицај разблажења. Концентрација нитрита се изражава као  $\mu\text{mol/L}$  у  $10^6$  ћелија/mL. Експеримент је урађен у трипликату.

#### 3.13.4. Одређивање концентрације редукованог (GSH) и оксидованог (GSSG) глутатиона

Спектрофотометријска метода за одређивање концентрације редукованог глутатиона (GSH) заснива се на оксидацији редукованог глутатиона сулфидним реагенсом 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB) при чему се формира жути продукт 5'-тио-2-нитробензоева киселина (TNB) чија се промена интензитета мери на 405 nm <sup>143</sup>.

Концентрација оксидованог глутатиона (GSSG) одређена је на основу редукованог глутатиона употребом ензима глутатион редуктазе, при чему се 4-винилпиридином спречава спонтанта оксидација глутатиона.

Принцип:

Микротитар плоче које садрже ћелијске линије HCT-116 и MDA-MB-231 контролне и третиране радним растворима једињења **3**, **4** и **5** инкубирају се у временском периоду од 24 h, 48 h и 72 h. При истеку времена инкубације плоче се центрифугирају 10 минута на 1000 rpm и 4 °C, након чега се из бунарића плоче аспирира медијум и у овако добијен супернатант додаје се 100 µL 2,25 % сулфосалицилне киселине. Овако припремљена плоча се затим држи на леду 15 минута а затим се центрифугира 15 минута при 1000 rpm. У 50 µL овако добијеног супернатанта додаје се 100 µL реакционе смеше (припремљене пред сам почетак рада) која садржи 1 mM DTNB, растворен у DMSO-у и допуњен фосфатним пуфером до потребне запремине. Микротитар плоча се затим инкубира на собној температури у периоду од 5 минута након чега се апсорбанца читава на 405 nm. Концентрација редукованог и оксидованог глутатиона се рачуна из стандардне криве добијене из познатих концентрација GSH по једначини:

$$\text{nmol GSH/mL} = A/F \times R \quad (7)$$

A – апсорбанца; F – фактор добијен из нагиба криве; R – утицај разблажење. Концентрација редукованог и оксидованог глутатиона се изражава се у nmol/mL (µmol/L). Експеримент је урађен у трипликату.

### 3.13.5. Статистичка обрада резултата

Сви експерименти су урађени у трипликату, а резултати су изражени као средња вредност три независна експеримента ± стандардна грешка (SE). Резултати су обрађени у



програму за статистичку обраду резултата SPSS (Chicago, IL) (SPSS for Windows, ver. 17, 2008).

### **3.14. Испитивање интеракција нафтохинона 3, 4 и 5 са молекулима од биолошког значаја**

#### *3.14.1. Припрема радних раствора*

Основни раствори 3, 4 и 5 концентрације  $2,0 \times 10^{-3}$  M направљени су растварањем нафтохинона у малој количини DMSO-а, а затим су разблажени додатком фосфатног пуфера (pH 7,4) тако да финална концентрација DMSO-а не би била већа од 0,5 % (v/v). Радни раствори концентрација од 0 до  $1,6 \times 10^{-5}$  M добијени су сукцесивним разблаживањем основних раствора фосфатним пуфером. Основни раствор хуманог серум албумина (HSA) концентрације  $2,0 \times 10^{-5}$  M направљен је растварањем HSA у фосфатном пуферу. Полазни раствор СТ-ДНК добијен је растварањем у фосфатном пуферу, а његова концентрација ( $2,0 \times 10^{-3}$  M) одређена је спектрофотометријски на 260 nm на основу коефицијента моларне апсорптивности  $\epsilon_{260}=6600$  L/molcm. Чистоћа раствора ДНК проверена је праћењем односа апсорбанци на таласним дужинама 260 nm и 280 nm. Раствор је за резултат односа апсорбанци  $A_{260}/A_{280}$  дао 1,86, што указује да је раствор ДНК слободан од протеина<sup>144</sup>. Раствори етидијум-бромида (ЕВ) концентрације  $1,0 \times 10^{-3}$  M и Hoechst 33342 концентрације  $1,0 \times 10^{-3}$  M добијени су растварањем у фосфатном пуферу (pH 7,4). Сви припремљени раствори чувани су у мраку на 4 °C, и употребљени у временском периоду од четири дана.

#### *3.14.2. UV-Vis спектрофотометријска мерења*

Апсорпциони спектри реакције титрације раствора молекула HSA нафтохинонима 3, 4 и 5 снимани су у области од 235-800 nm, при чему је концентрација HSA одржавана константном ( $2,0 \times 10^{-6}$  M), док је концентрација нафтохинона варијала од 0 до  $1,6 \times 10^{-5}$  M.

У циљу одређивања начина везивања нафтохинонима **3**, **4** и **5** са молекулом СТ-ДНК апсорпциони спектри реакције титрације снимани су у области од 235-800 nm употребом две сличне методе. Применом прве методе концентрација нафтохинона **3**, **4** и **5** је одржавана константном ( $8,0 \times 10^{-5}$  M за сваки од нафтохинона), док је концентрација СТ-ДНК варијала од 0 до  $1,73 \times 10^{-4}$  M. Другом методом константном је одржавана концентрација СТ-ДНК ( $1,66 \times 10^{-5}$  M), док је концентрација нафтохинона **3**, **4** и **5** сукцесивно расла од 0 до  $2,4 \times 10^{-5}$  M.

Такође, у истој области снимљени су и апсорпциони спектри за растворе који су садржали слободне нафтохиноне, слободну СТ-ДНК и HSA у одговарајућим концентрацијама коришћеним у реакцији титрације. Сви спектри снимани су на собној температури уз употребу одговарајућих слепих проби и бланкова. Сваки од експеримената поновљен је три пута.

### 3.14.3. Флуориметријска мерења

Флуоросцентни емисиони спектри титрације молекула HSA нафтохинонима **3**, **4** и **5** снимани су у области од 300-460 nm при ексцитацији на  $\lambda_{ex}=295$  nm. Концентрација HSA одржавана је константном ( $2,0 \times 10^{-6}$  M), док су концентрације поменутих нафтохинона варијале од 0 до  $1,6 \times 10^{-5}$  M.

Са циљем одређивања начина везивања нафтохинона **3**, **4** и **5** за молекул СТ-ДНК снимани су и флуоресцентни емисиони спектри компетативних реакција између нафтохинона и етидијум-бромида везаног за молекул СТ-ДНК (ЕВ-ДНК) (снимани су у области од 550-700 nm при ексцитацији на  $\lambda_{ex}=520$  nm). Спектри су снимани при константној концентрацији СТ-ДНК ( $1,72 \times 10^{-5}$  M) и ЕВ ( $1,2 \times 10^{-5}$  M), док је концентрација испитиваних нафтохинона варијала од 0 до  $2,4 \times 10^{-5}$  M. Такође, испитивана је и компетативна реакција између поменутих нафтохинона и Neochst 33342 молекула везаног за молекул СТ-ДНК (Н-СТ-ДНК). Спектри су снимани у области од 380-600 nm при ексцитацији на  $\lambda_{ex}=350$  nm. Концентрација Neochst 33342 ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) и СТ-ДНК ( $1,66 \times 10^{-5}$  M) одржавана је константном, а концентрација нафтохинона је расла од 0 до  $2,4 \times 10^{-5}$  M. Ширина прореза између ексцитације је била 5 nm, док је ширина прореза између емисије

износила 6 nm. Снимљени су и спектри раствора који садрже слободне нафтохиноне **3**, **4** и **5** одговарајућих концентрација. Флуоресцентни спектри снимани су на собној температури уз употребу одговарајућих слепих проби и бланкова, а експерименти су поновљени три пута.

Како би одредили константу формирања комплекса ( $K_{sv}$ ) нафтохинона **3**, **4** и **5** са биомолекулима, коришћена је Стерн-Волмерова (Stern-Volmer) једначина<sup>145,146</sup>

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (8)$$

где су  $F_0$  и  $F$ -интензитети флуоресценције пре и после додатка поменутих нафтохинона,  $K_q$ - биомолекулска константа гашења,  $\tau_0$ - представља време живота флуорофоре у одсуству комплекса и сматра се да износи  $10^{-8}$  s, и  $[Q]$ - концентрација слободног комплекса.

Константа стабилности ( $K_a$ ) и број везујућих места ( $n$ ) за макромолекул може се израчунати коришћењем једначине:

$$\log F_0 - F / F = \log K_a + n \log[Q] \quad (9)$$

Резултати су приказивани графички као зависност  $\log(F_0 - F)/F$  од  $[Q]$ . Из пресека праве  $\log F_0 - F / F = f(\log[Q])$  са ординатом може се добити вредност за  $K_a$ , а број везујућих места ( $n$ ) се добија из нагиба праве.

#### 3.14.4. Молекулски докинг

Испитивање могућих интеракција нафтохинона **3**, **4** и **5** са биомолекулима HSA и ДНК извршено је и применом молекулског докинга употребом AutoDock 4.2 софтверског пакета<sup>147</sup>. Тродимензионалне кристалне структуре молекула HSA (6EZQ) и ДНК (dodecamer d(CGCAAATTTGCG)2 [PDB: 102D]) преузете су из RCSB Protein Data Bank<sup>148,149</sup>. Discovery Studio 4.0 (BIOVIA Discovery Studio 2016) коришћен је за припрему молекула HSA и ДНК, при чему су отклоњени кристалирани лиганди, молекули воде и други кофактори<sup>150</sup>. Израчунавање Колманове (Kollman) шарже и додавање поларних атома водоника учињено је употребом интерфејса AutoDockTools (ADT). Оптимизација

истраживаних молекула извршена је ВЗLYP-D3BJ методом са 6-311+G(d,p) базичним сетом употребом Gaussian09 софтверског пакета <sup>151</sup>. У току симулације молекулског докинга задржане су ригидне структуре молекула HSA и ДНК у ADT, док су нафтохинони били флексибилни. За израчунавање парцијалних шаржи коришћена је Geistenger-ова метода. Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) коришћен је у свим рачунима. У свим експериментима молекулског докинга коришћена је кутија величине 60 x 60 x 60 са размаком решетке 0,375 Å у активном месту рецептора чиме су покривена сва везивна места молекула HSA и ДНК и обезбеђено је слободно кретање испитиваних нафтохинона.

### 3.15. Испитивање антибактеријске активности

#### 3.15.1. Коришћене бактерије

Приликом одређивања антибактеријске активности изолованих једињења **1-7** коришћено је пет грам позитивних бактерија (*Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium arborescens*, *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus epidermidis*) и пет грам негативних бактерија (*Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas roteolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Yersinia intermedia*). Тестиране бактерије изоловане су из дивљих и слатководних риба. Ови клинички изолати су идентификовани применом MALDI TOF масене спектрометрије на MALDI TOF MS Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, USA), а дефинисана је и њихова резистенција (отпорност) на конвенционалне антибиотике. Клинички изолати бактерија потичу из колекције Департмана за Микробиологију, Факултета за Биотехнологију и Прехрамбене науке у Нитри, Словачка.

#### 3.15.2. Припрема бактерија

Суспензије бактерија су припремљене методом директне колоније. Све бактерије су до експеримената чуване на -80 °C, док се инкубирање изводи на Mueller Hinton агару (Merck, Germany) у временском периоду од 24 h на 36 °C. Густина почетне суспензије одређена је поређењем са 0,5 МекФарландовим (McFarland's) стандардом <sup>152</sup>. Почетне

суспензије бактерија садржале су  $10^8$  CFU/mL (енг. *Colony-Forming Unit*). Разблажења почетне суспензије (1:100) прављена су стерилним 0,85 % натријум хлоридом (NaCl).

### 3.15.3. Коришћени стандардни антибиотици

У циљу дефинисања резистенције (отпорности) тестираних клиничких изолата бактерија коришћени су стандардни антибиотици Гентамицин (GEN), Еритромицин (ERY), Ампицилин (AMP), Тетрациклин (TETc), Имипенем (IMPe), Меропенем (MEM), Пиперацилин (PIP), Тигециклин (TGC), Ванкомицин (VAN), Норфлоксацин (NOR) и Хлорамфеникол (CHL).

### 3.15.4. Микродилуциона метода

Минимална инхибиторна концентрација (МИК) (енг. *Minimal inhibitory concentrations-MIC*) одређена је микродилуционом методом према препоруци Института за Клиничке и Лабораторијске Стандарде (CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute recommendation*) у Милер Хинтоновом (Mueller Hinton) бујону (Biolife, Italy)<sup>153, 154</sup>.

#### 3.15.4.1. Припрема радних раствора

Основни раствори изолованих једињења *I-7* и коришћених антибиотика направљени су растварањем 10 mg сваког од нафтохинона (односно антибиотика) у 10  $\mu$ L DMSO-а. Потом се додаје 990  $\mu$ L хранљивог медијума у сваки од раствора (нафтохинона, односно антибиотика), тако да је крајња концентрација тест супстанци (нафтохинона, односно антибиотика) у растворима 1000  $\mu$ g/mL. Радни раствори концентрација у опсегу од 0,25 до 512  $\mu$ g/mL су добијени даљим разблаживањем основних раствора хранљивом подлогом. Финална концентрација DMSO-а у културама бактерија није била већа од 0,5 % (v/v).

#### 3.15.4.2. Третман бактерија

У микротитар плоче са 96 бунарића додата је хранљива подлога, а затим и по 100  $\mu$ L испитаваних изолованих једињења или антибиотика. У сваки од бунарића додата је и

суспензија сваке од бактерија, при чему је финална густина истих била 0,5 McFarland. Бунарићи који нису садржали испитивана изолована једињења или антибиотике коришћени су као негативна контрола раста, а бунарићи са DMSO-ом као негативна контрола. Након 24 h од инкубације на 37 °C, инхибиција раста тест бактерија одређена је мерењем апсорбанце на 450 nm у микроплејт читачу Biotek EL808 са могућношћу мешања (Biotek Instruments, USA). Вредности апсорбанце овако припремљених микротитар плоча мерене су пре и после експеримента, а разлика између два мерења одређена је као раст. Грешка мерења одређена је на 0,05 вредности апсорбанце. Тест је поновљен осам пута.

### *3.15.5. Статистичка обрада резултата*

Разлике у измереној апсорбанци пре и после анализе изражене су као сет бинарних вредности и додељене израчунатим концентрацијама. Вредност 1 (инхибиторни ефект) је додељена очитаним вредностима апсорбанце мањим од 0,05, док је вредност 0 (без инхибиторног или стимулативног ефекта) додељена вредностима апсорбанце већим од 0,05. Обрада резултата је извршена употребом probit анализе у оквиру Statgraphics софтверског пакета.



*4. Резултати*

*и*

*дискусија*

#### 4.1. Изоловање нафтохинонских деривата из корена (ризوما) биљке *O. visianii* Clem

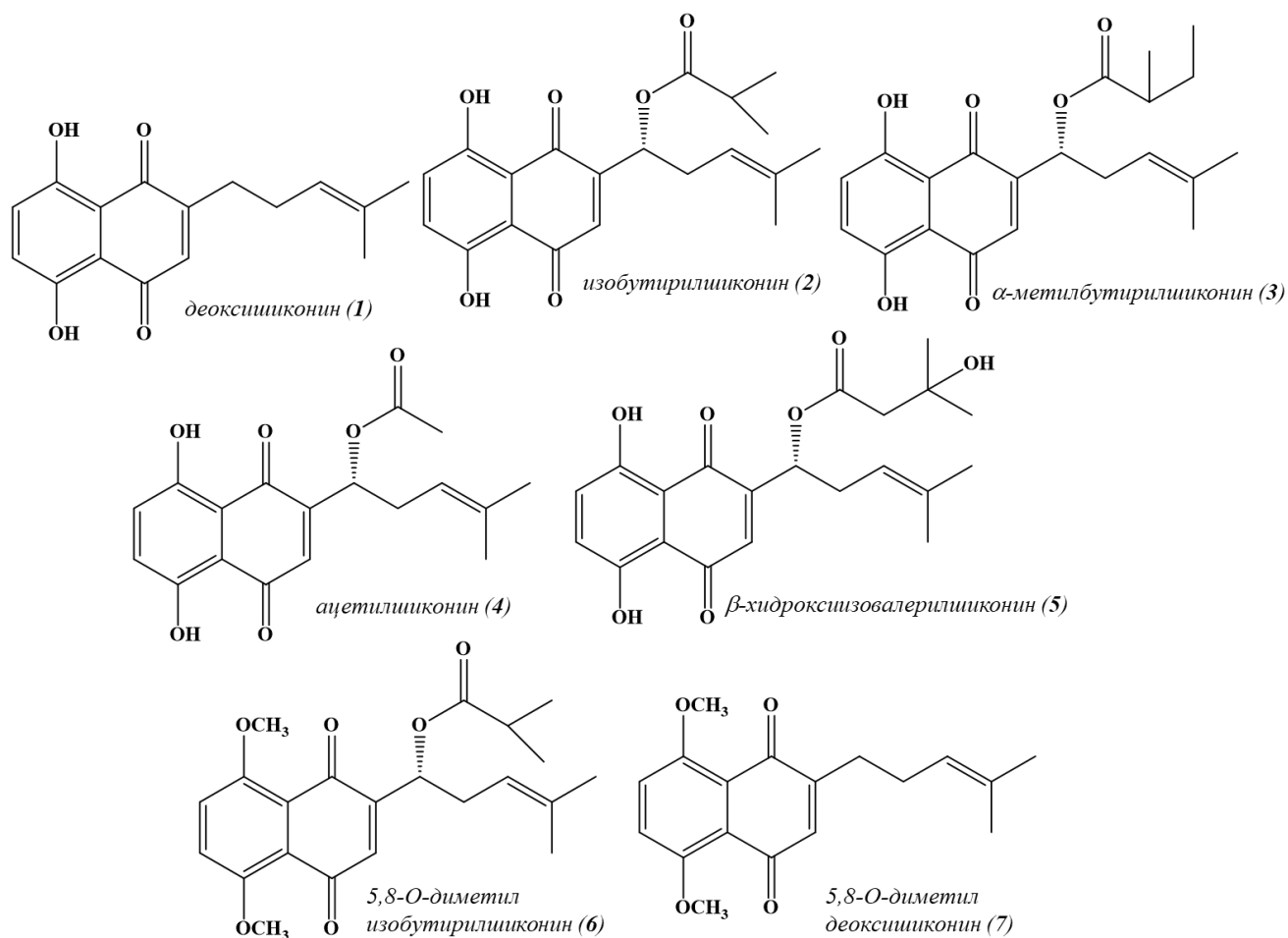
Литературни подаци говоре о томе да корен биљака породице Boraginaceae има велику примену у традиционалној медицини<sup>56</sup>. Такође, корен биљака ове фамилије богат је нафтохинонским дериватима који су нашли примену као природне боје у храни, козметици и текстилној индустрији<sup>56,155,156</sup>. Корен биљке *O. visianii* Clem је врло слабо проучаван. Осим податка да је у њему констатован шиконин, до сада други литературни подаци о хемијском саставу и фармаколошкој активности ове биљке нису постојали<sup>27</sup>. Имајући у виду представљене чињенице, први задатак ове дисертације састојао се у изоловању и структурном карактерисању изолованих једињења из ризома биљке *O. visianii* Clem.

Прелиминарно фракционисање екстракта добијеног употребом растварачке смеше петрол етар:метилен хлорид (1:1 v/v) извршено је применом нормално фазне хроматографије на колони пуњеној силика гелом. Овим је најпре добијено двадесетседам фракција које су након тога подвргнуте аналитичкој танкослојној хроматографији у циљу проналажења сличности/разлике између фракција. Фракције које су садржале једињења истих ретенционих времена су спојене и упарене на ротационом вакуум упаривачу. Овако припремљене фракције подвргнуте су препаративној танкослојној хроматографији која је за резултат дала 7 једињења. Применом семипрепаративне HPLC методе добијено је седам чистих нафтохинонских деривата и то: деоксишиконин (**1**) (19 mg), изобутирилшиконин (**2**) (38 mg),  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (**3**) (63 mg), ацетилшиконин (**4**) (166 mg),  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (**5**) (131 mg), 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин (**6**) (18 mg) и 5,8-*O*-диметил деоксишиконин (**7**) (32 mg) (Слика 4.1.).

Недостатак прелиминарног фракционисања на колони пуњеној силика гелом се огледао у значајном губитку приноса нафтохинона. Разлог овоме је присуство резидуалног гвожђа у силика гелу са којим присутни нафтохинони из екстракта формирају тамно-љубичасто обојене комплексе, односно долази до њиховог иреверзибилног везивања на колони. Осим тога, формиран комплекс интензивно тамно-љубичасте боје значајно смањују резолуцију колоне, као и визуелну обсервацију одвајања фракција.



Представљена метода модификована је у циљу што бржег и ефикаснијег изоловања нафтохинонских деривата шиконина. У циљу елиминисања хроматографских проблема везаних за присуство резидуалног гвожђа коришћена је смеша за елуирање која садржи 0,1 % сирћетне киселине. При развијању методе је констатовано да се у слабо киселој средини спречава ирверзибилно везивање шиконинских деривата (не долази до формирања тамно-љубичасто обојених једињења). По модификованој методи исти екстракт (петрол етар:метилен хлорид (1:1 v/v)) је прелиминарно фракционисан применом препаративне танкослојне хроматографије. Овим поступком је добијен мањи број фракција (осам), које су затим подвргнуте хроматографији на колони (пуњеној Sephadex LH20) у циљу њиховог пречишћавања. Издајање на колони је праћено аналитичком танкослојном хроматографијом на силика гелу, а додатно пречишћавање извршено је применом семипрепаративне HPLC.

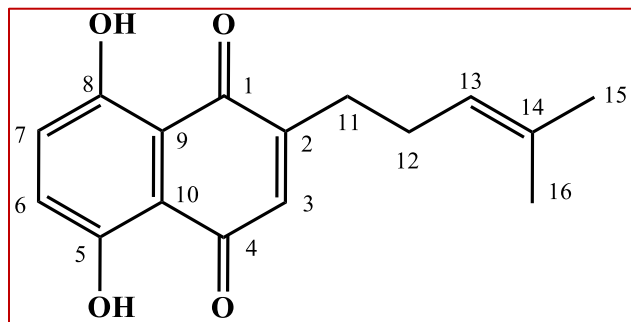


Слика 4.1. Структуре изолованих нафтохинона

## 4.2. Структурна карактеризација изолованих нафтохинона 1-7

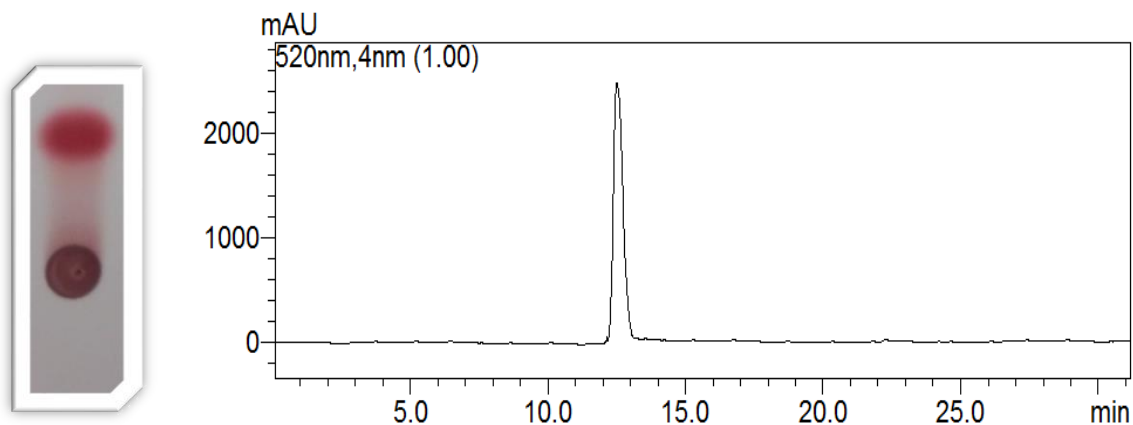
Структурна карактеризација изолованих нафтохинона извршена је применом UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопских техника, као и употребом масене спектроскопије високе резолуције. Након дескрипције свих спектроскопских података и дефинисања структуре изолованих једињења, сви добијени резултати су упоређени са претходно публикованим литературним подацима <sup>157-161</sup>. Измерена је и оптичка ротација ( $[\alpha]_{\text{D}25}$ ), а добијене позитивне вредности овог мерења потврдиле су да су изоловани нафтохинони **2-6** из корена биљке *O. visianii* деривати шиконина. Од изолованих деривата нафтохинона 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин (**6**) је први пут идентификован у природном извору.<sup>17</sup> Структуре изолованих нафтохинонских деривата представљене су на *Слика 4.1.*

### 4.2.1. Деоксишиконин (**1**)



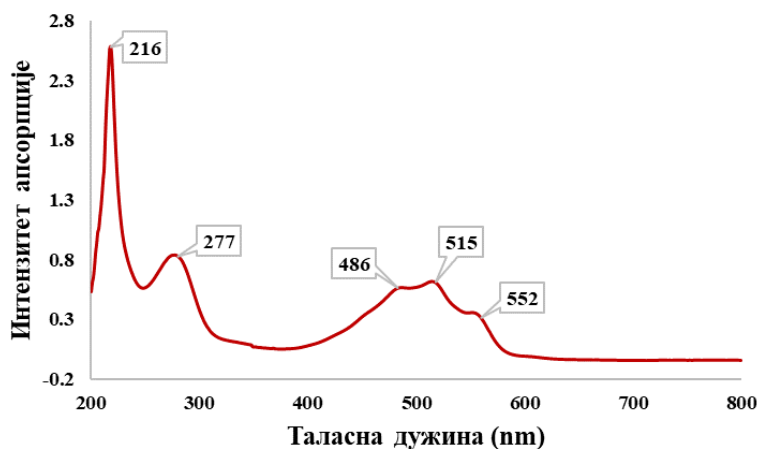
Деоксишиконин (**1**) (5,8-дихидрокси-2-(4-метилпент-3-енил)нафтален-1,4-дион) је изолован у облику црвено-љубичасте чврсте супстанце. Након изоловања, једињење је најпре подвргнуто аналитичкој TLC

хроматографији уз петрол етар:етил ацетат (90:10 v/v) растварачку смешу за елуирање. Овако добијен хроматограм представљен је на *Слика 4.2.* и присуство једне интензивне мрље указује на високи степен чистоће једињења након изоловања. Након TLC хроматографије примењена је и HPLC анализа. Добијени хроматограм приказан је на *Слика 4.2.*, а присуство само једног пика указује на високу чистоћу изолованог једињења. Ретенционо време за деоксишиконин износило је  $\text{RT}=12,612$  min.



Слика 4.2. TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми деоксишиконина (I)

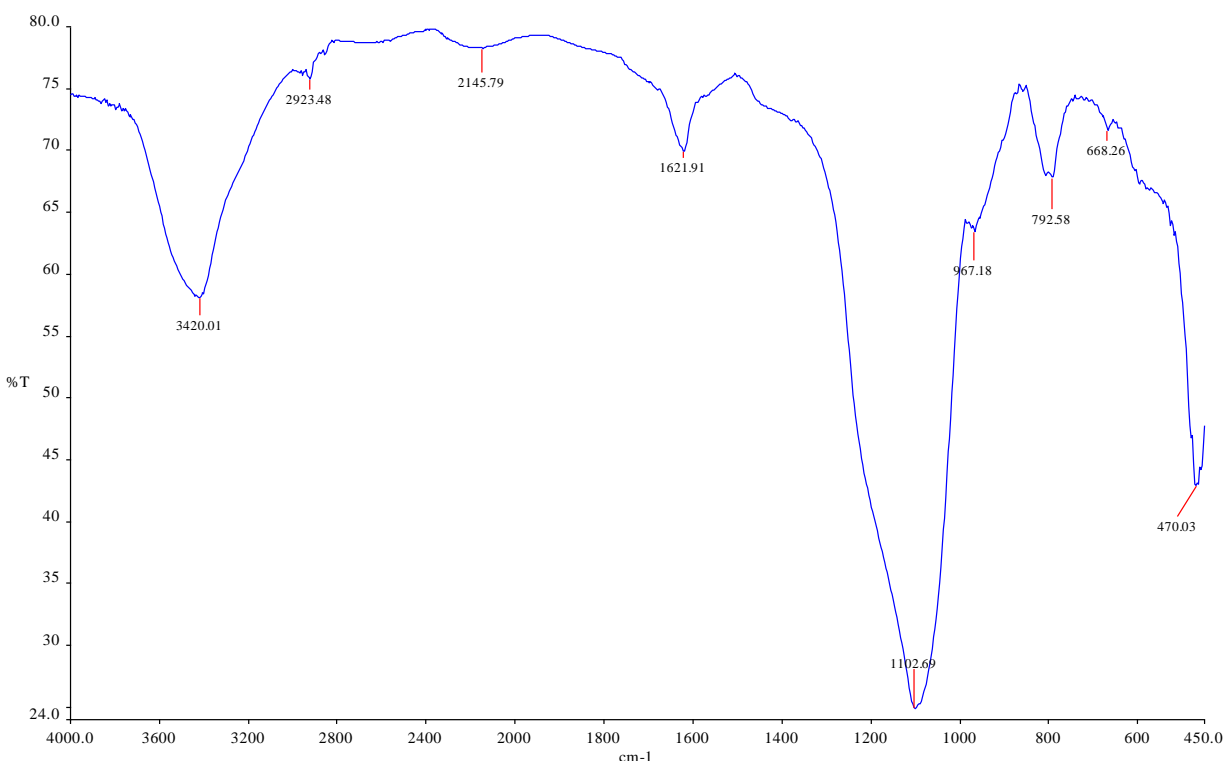
У циљу структурне карактеризације изолованог једињења најпре је примењена електронска апсорпциона спектроскопија. Добијени спектар представљен је на Слика 4.3.. Деоксишиконин карактеришу два апсорпциона максимума у ултраљубичастом делу спектра на 216 nm и 277 nm. У видљивом делу спектра примећује се присуство серије апсорпционих максимума лоцираних на 468 nm, 515 nm и 552 nm, који указују на присуство нафтазаринског прстена у молекулу.



Слика 4.3. UV-Vis спектар деоксишиконина (I)

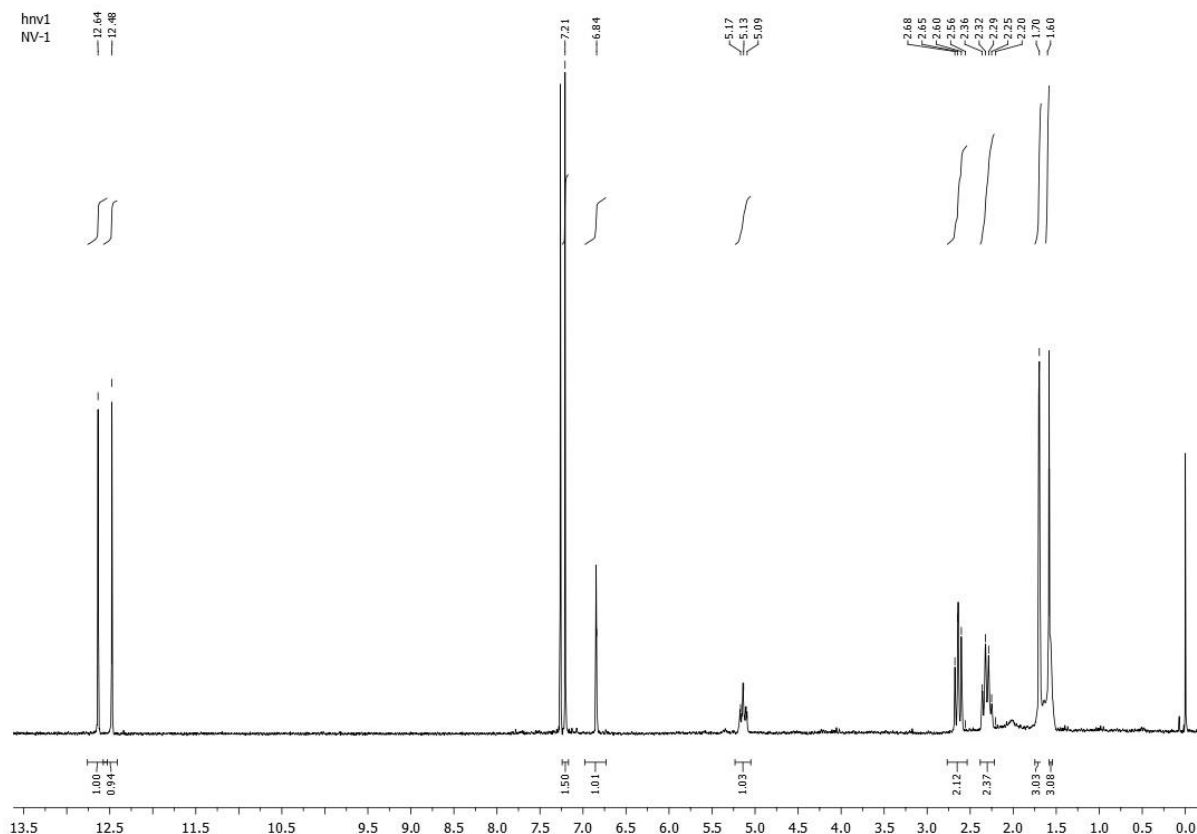
Спектар добијен применом инфрацрвене спектроскопије приказан је на Слика 4.4.. Са представљеног спектра јасно се уочава присуство широке траке у области од  $3650\text{ cm}^{-1}$  до  $3160\text{ cm}^{-1}$  која указује на присуство ОН група у молекулу деоксишиконина. Присуство трака које одговарају скелетним валенционим вибрацијама C=C веза нафтазаринског језгра

идентификоване су на  $1621\text{ cm}^{-1}$ ,  $1573\text{ cm}^{-1}$  и  $1457\text{ cm}^{-1}$ . Оштре траке на  $1222\text{ cm}^{-1}$  и  $1102\text{ cm}^{-1}$  одговарају валенционим вибрацијама C-O веза. Такође, неопходно је напоменути да је у IR спектру овог молекула примећено одсуство интензивне траке која одговара C=O вибрацији естарске групе.



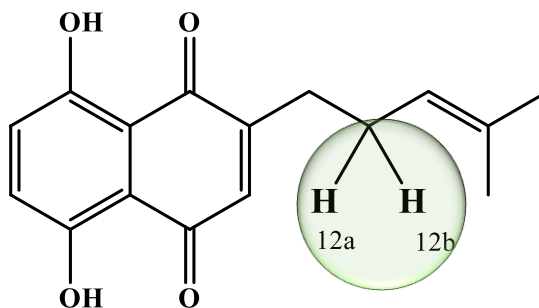
Слика 4.4. IR спектар деоксишиконина (I)

$^1\text{H}$  NMR спектар деоксишиконина приказан је на Слика 4.5.. Интерпретацијом спектра најпре су уочена два синглета на 1,60 ppm и 1,70 ppm са интегралима вредности 3 које одговарају протонима метил група (H-15 и H-16) везаних за C-14 угљеников атом.



Слика 4.5.  $^1\text{H}$  NMR спектар деоксишиконина (**1**)

Мултиплет који се налази на 2,28 ppm одговара Н-11 протонима, док мултиплет примећен на нешто нижем пољу (2,60 ppm) одговара геминалним Н-12а и Н-12б протонима (Слика 4.6.).

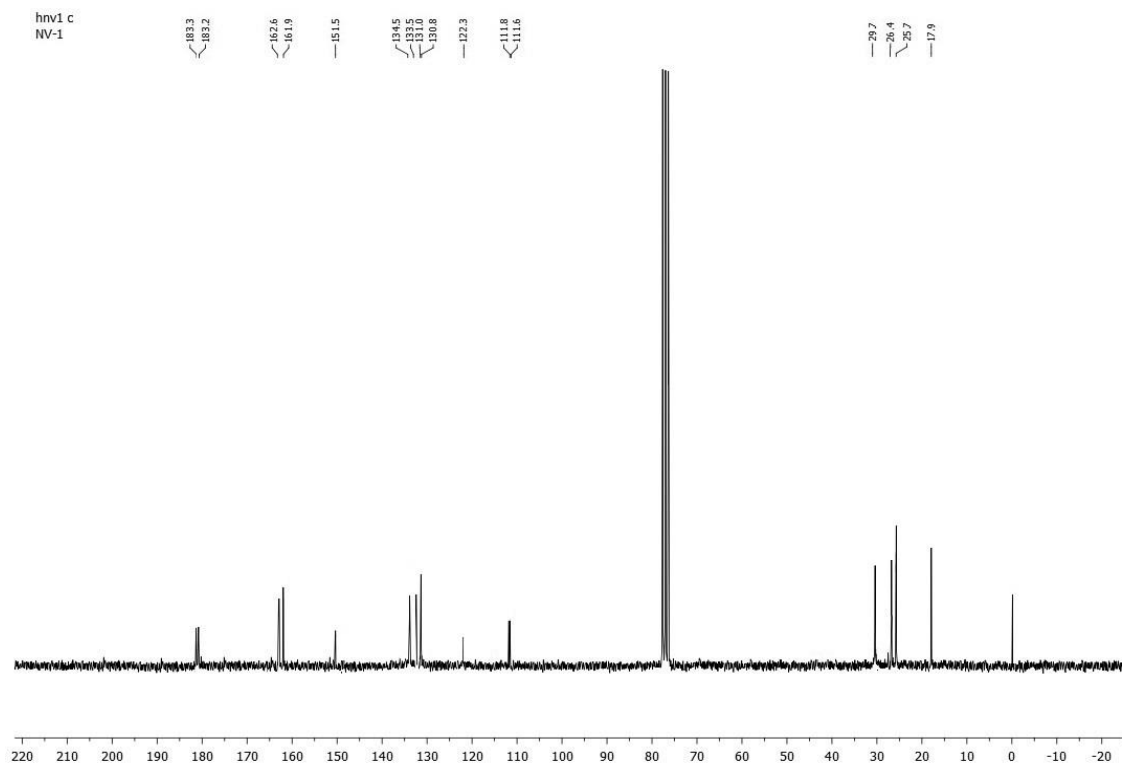


Слика 4.6. Структура деоксишиконина (**1**) са истакнутим хемијски и магнетно нееквивалентним, геминалним протонима на С-12 угљениковом атому

Још један од протона бочног низа везаног за нафтазаринско језгро Н-13 уочен је на 5,13 ppm, у облику триплета са константом спрезања од  $J=7,1$  Hz. Синглет интеграла 1 водоника Н-3 из хинонског дела нафтазаринског прстена дао је сигнал на 6,84 ppm, док

синглет истог интеграла на нижем пољу (7,21 ppm) одговара хемијском померању протона Н-6 и Н-7. Из представљеног спектра примећено је и присуство две хидроксилне групе на основу два сигнала у облику синглета и интеграла 1 који резонирају на 12,48 ppm и 12,64 ppm (С-5-ОН и С-8-ОН).

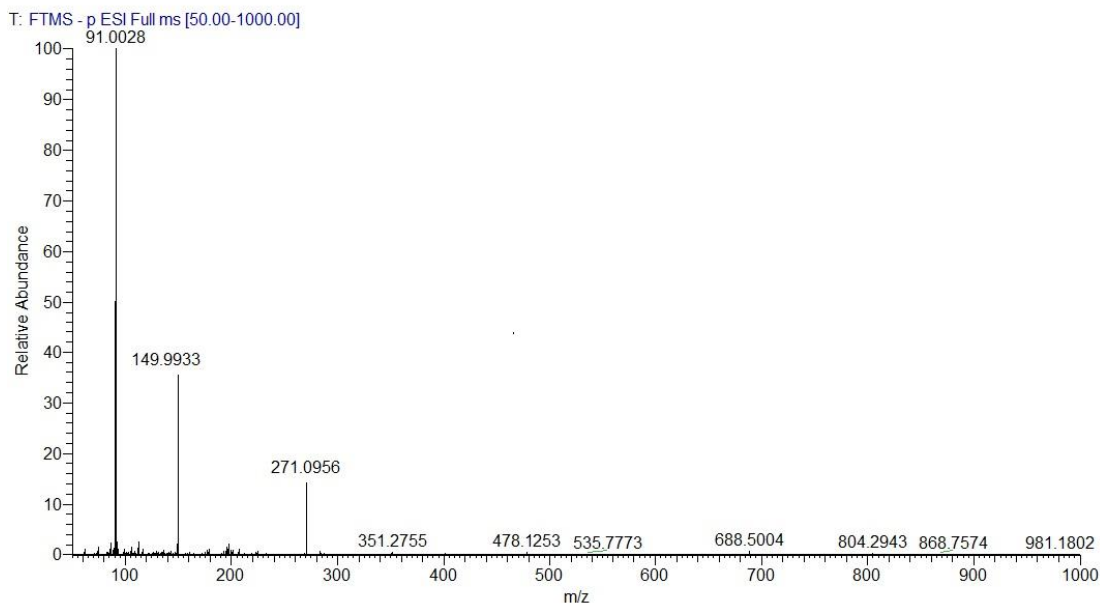
$^{13}\text{C}$  NMR спектар деоксишиконина потврдио је присуство бочног низа везаног за нафтазарински прстен, сигналама на 17,9 ppm, 25,7 ppm, 26,4 ppm и 29,7 ppm, који одговарају угљениковим атомима С-16, С-15, С-12 и С-11, док су на значајно нижем пољу (122,3 ppm и 133,5 ppm) уочени сигнали од С-13 и С-14 угљеникових атома овог дела молекула (Слика 4.7.).



Слика 4.7.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар деоксишиконина (I)

Угљеници карбонилних група из нафтазаринског прстена (С-1 и С-4) дали су сигнале на 183,2 ppm и 183,3 ppm, док су угљеникови атоми за које су везане хидроксилне групе (С-8 и С-5) дали сигнале на нешто вишим пољима, и то на 161,9 ppm и 162,6 ppm. Нафтазаринско језгро окарактерисано је и угљениковим атомима С-2, С-3, С-6, С-7, С-9 и С-10, од којих су С-9 и С-10 идентификовани на вишим (111,6 ppm и 111,8 ppm), а С-2, С-3, С-6 и С-7 на нижим пољима (151,2 ppm, 134,5 ppm, 130,7 ppm и 131,0 ppm).

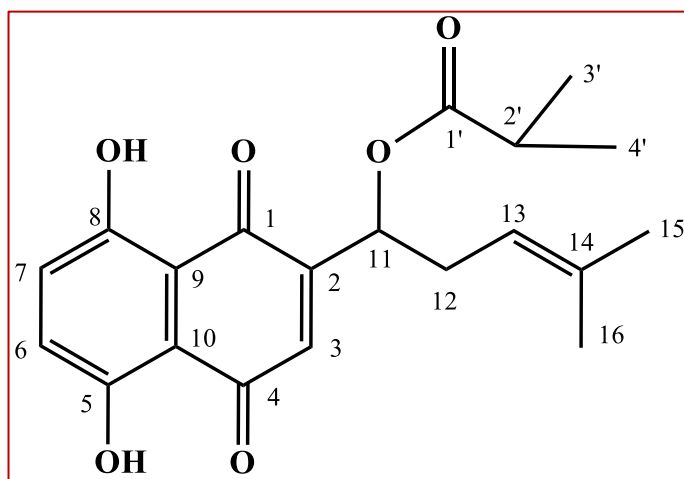
Масени спектар високе резолуције деоксишиконина дао је квазимолекулски јон  $[M-H]^-$  на 271,0956 масених јединица ( $m/z$ ), а одговарајући спектар је представљен на *Слика 4.8.* Добијена вредност за јон  $[M-H]^-$  јон одговара једињењу бруто формуле  $C_{16}H_{15}O_4$  масе  $m/z = 271,0970$  са грешком мерења од  $-3,340$  ppm.



*Слика 4.8.* Масени спектар високе резолуције деоксишиконина (**1**)

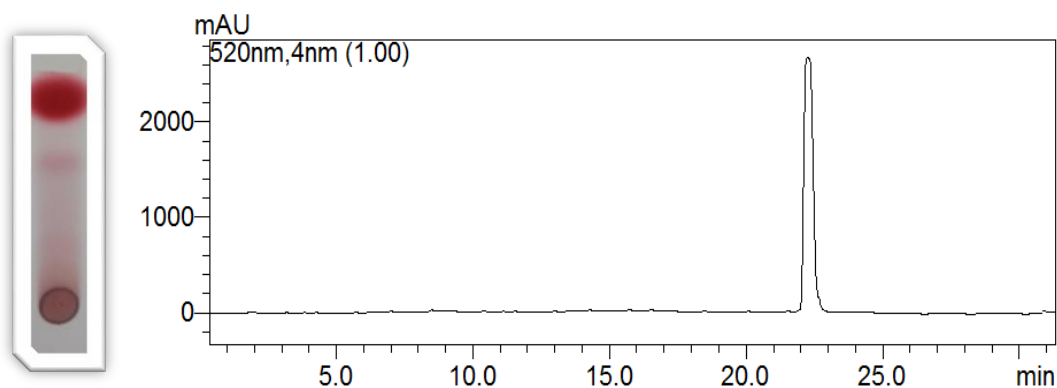
#### 4.2.2. Изобутирилишконин (**2**)

У виду црвено-љубичасте, чврсте супстанце изолован је изобутирилишконин (**2**) [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил изобутират]. Пре спектроскопске карактеризације применом аналитичких метода, TLC (употребом претходно наведене



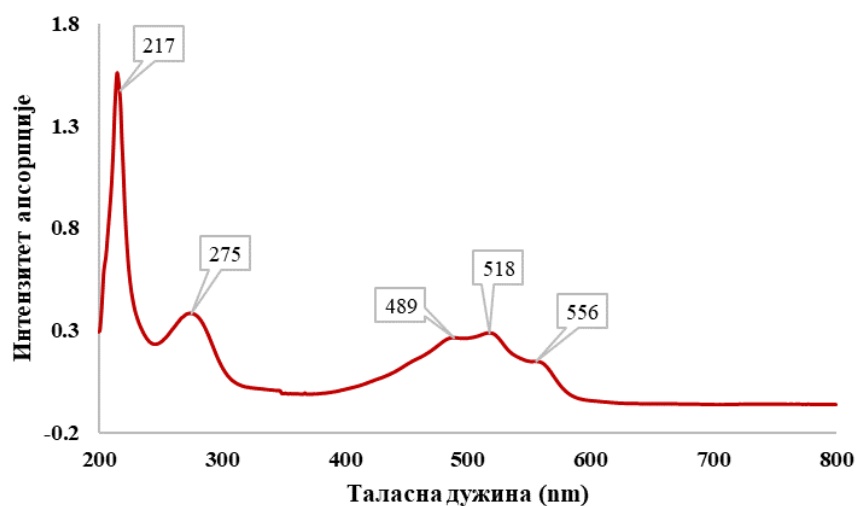
елуентске смеше) а затим и HPLC хроматографије, утврђена је чистоћа изолованог једињења. Присуство само једне интензивне мрље на TLC хроматограму и једног пика на

HPLC хроматограму (RT=22,314 min), представљеним на *Слика 4.9.* указују на то да је изобутирилшиконин изолован без присуства других деривата нафтохинона.



*Слика 4.9.* TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми изобутирилшиконина (2)

Приликом структурне карактеризације најпре је снимљен UV-Vis спектар (*Слика 4.10.*). У ултраљубичастом делу спектра јављају се два апсорпциона максимума на 217 nm и 275 nm. Као последица присуства нафтазаринског језгра у видљивом делу спектра овог деривата нафтохинона јављају се апсорпциони максимуми на 489 nm, 518 nm и 556 nm.

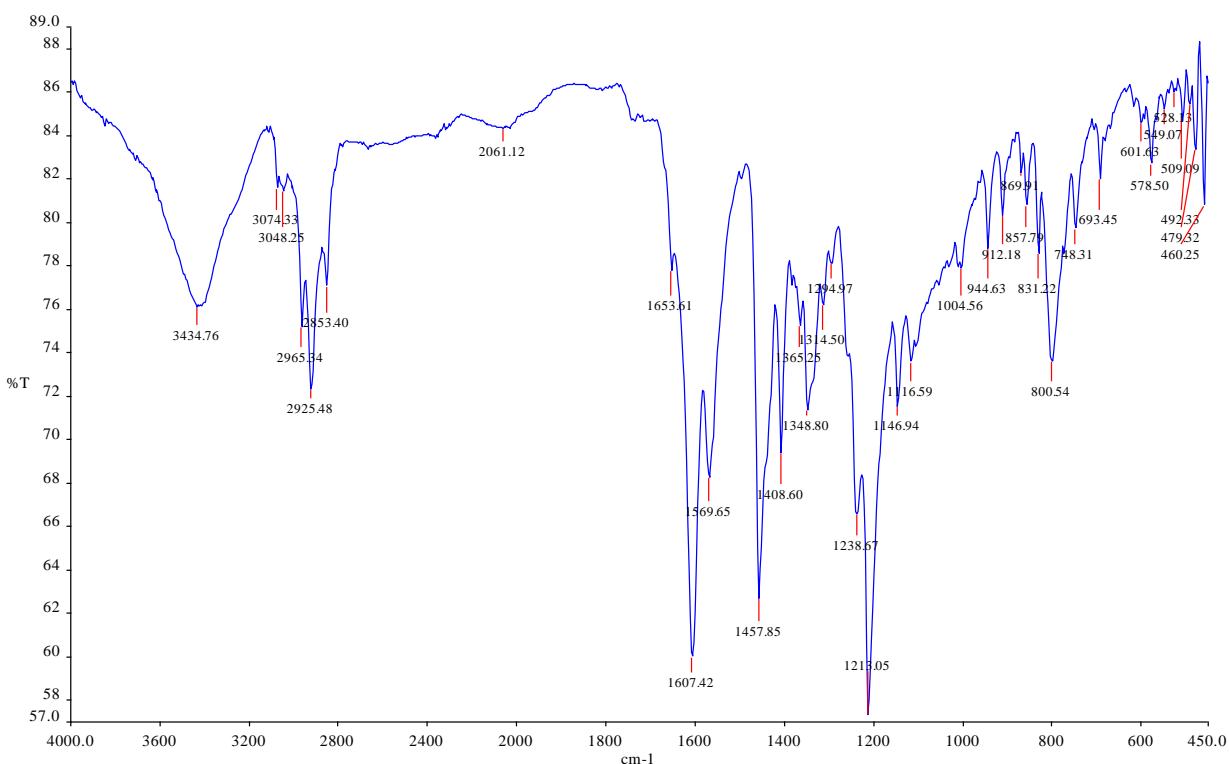


*Слика 4.10.* UV-Vis спектар изобутирилшиконина (2)

У циљу утврђивања присуства различитих функционалних група у молекулу изобутирилшиконина снимљен је и IR спектар који је представљен на *Слика 4.11.* Анализом спектра се најпре уочава присуство хидроксилне групе у области од 3680-3630



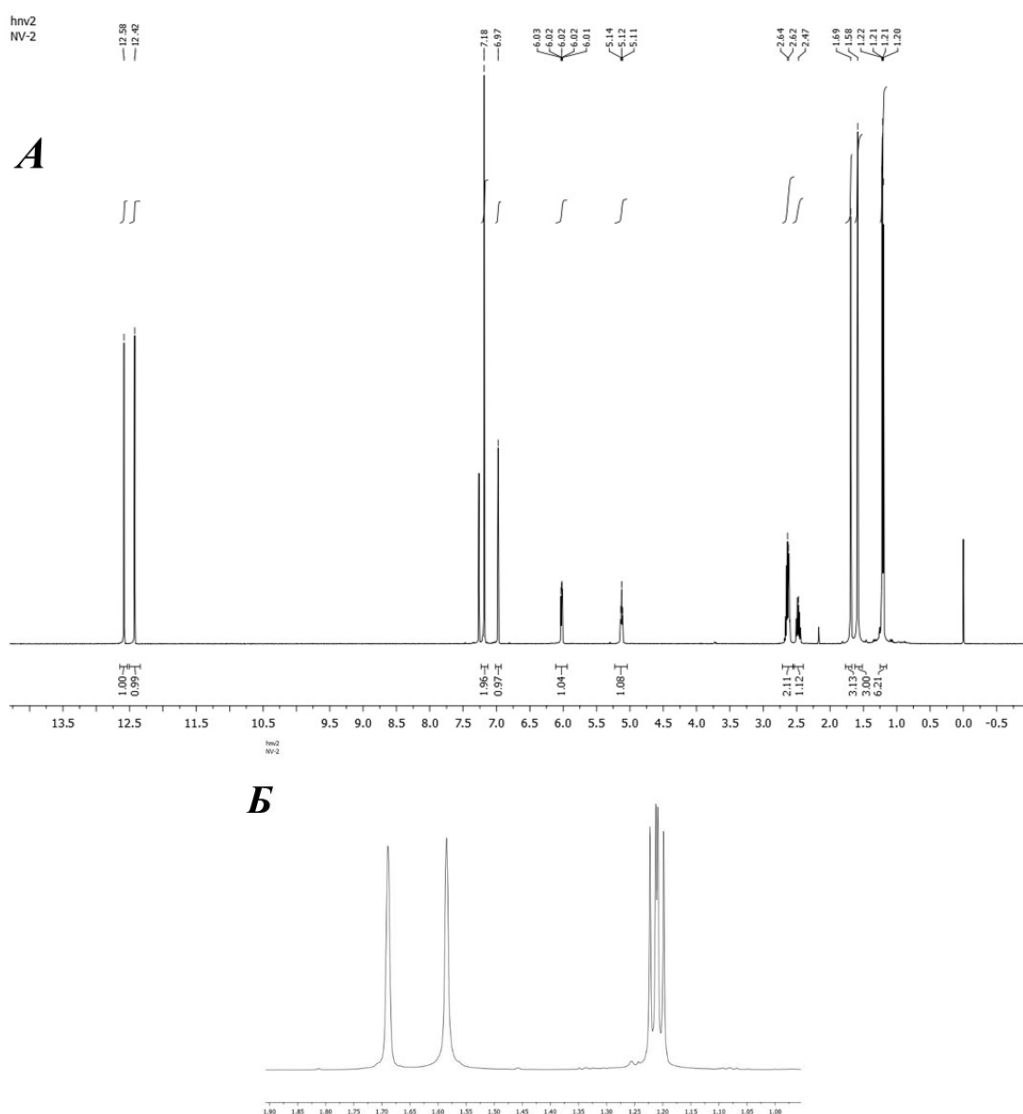
$\text{cm}^{-1}$ . За разлику од претходно описаног инфрацрвеног спектра за молекулу деоксишиконина, у спектру изобутирилшиконина примећена је интензивна трака на  $1735 \text{ cm}^{-1}$  која указује на присуство естарске  $\text{C}=\text{O}$  групе из бочног низа молекула. Скелетне вибрације нафтазарина идентификоване су на  $1607 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1569 \text{ cm}^{-1}$  и  $1457 \text{ cm}^{-1}$ , док су валенционе вибрације  $\text{C}-\text{O}$  веза у виду оштрих трака уочене на  $1238 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1213 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1146 \text{ cm}^{-1}$  и  $1116 \text{ cm}^{-1}$ .



Слика 4.11. IR спектар изобутирилишиконина (2)

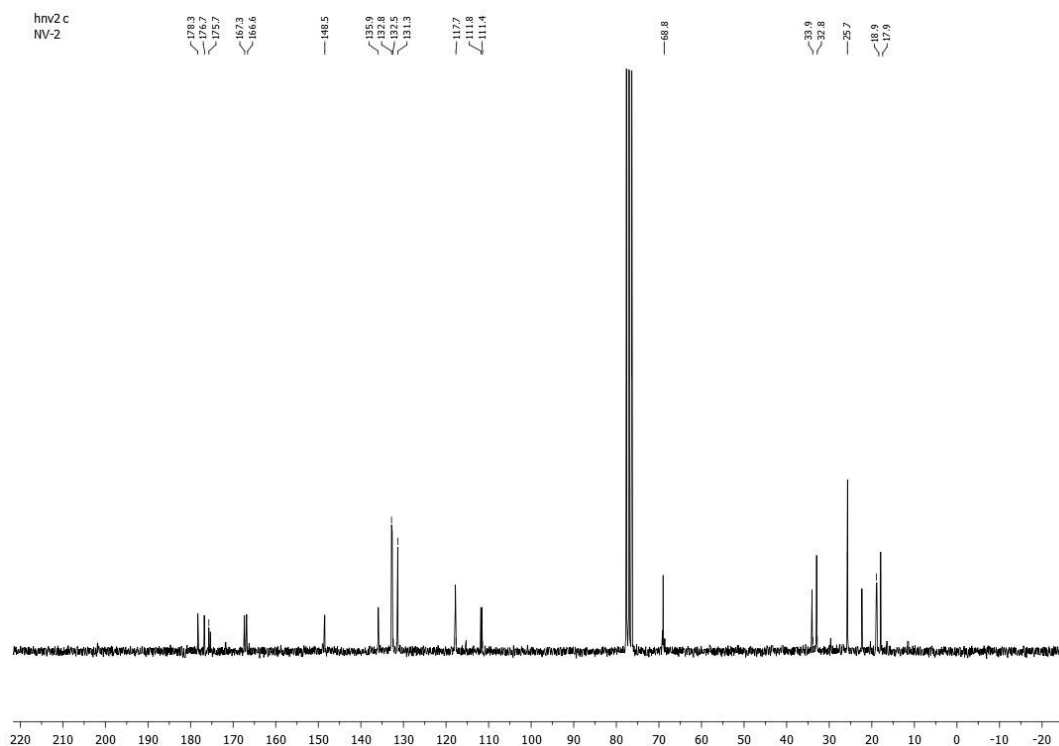
$^1\text{H}$  NMR спектар нафтохинонског деривата **2** представљен је на Слика 4.12.. У поређењу са истим спектром за молекулу деоксишиконина, у спектру изобутирилшиконина примећује се већи број сигнала у области од 1-3 ppm. Интерпретацијом спектра уочена су најпре два дублета интеграла 3 на 1,20 ppm и 1,22 ppm са константама спрезања од  $J=7,0$  Hz за које је утврђено да одговарају протонима (H-3' и H-4') из метил група везаних за C-2' угљеников атом изобутирил-естарског дела молекула. Присуство протона на C-2' потврђено је сигналом у облику мултиплета интеграла 1 на 2,64 ppm. Протони метил група везаних за C-14 угљеников атом идентификовани су у облику синглета интеграла 3 на сличним вредностима као и одговарајуће групе у спектру деоксишиконина, и то на 1,58 ppm и 1,69 ppm. Присуство протона из бочног низа нафтазаринског прстена, H-12a и H-12b, уочено је

на 2,47 ppm и 2,62 ppm у облику мултиплета, док Н-13 протон бочног ланца резонира на већој фреквенцији (5,12 ppm) у облику триплета са константом спрезања од  $J=7,5$  Hz. Услед присуства естарске групе у бочном ланцу, за угљеников атом С-11 везан је један протон који се сада јавља у облику дублет-дублета са константама спрезања од  $J=7,2$  Hz и  $J=4,5$  Hz на значајно нижем пољу (6,02 ppm) у односу на хемијско померање истих протона у молекулу деоксишиконина (2,28 ppm). Протони нафтазаринског прстена облика синглета уочени су на 6,97 ppm (Н-3) интеграла 1, и 7,18 ppm интеграла 2 (Н-6 и Н-7), док су на вишим вредностима хемијских померања запажени исти облици сигнала интеграла 1 од хидроксилних протона на 12,42 ppm и 12,58 ppm.



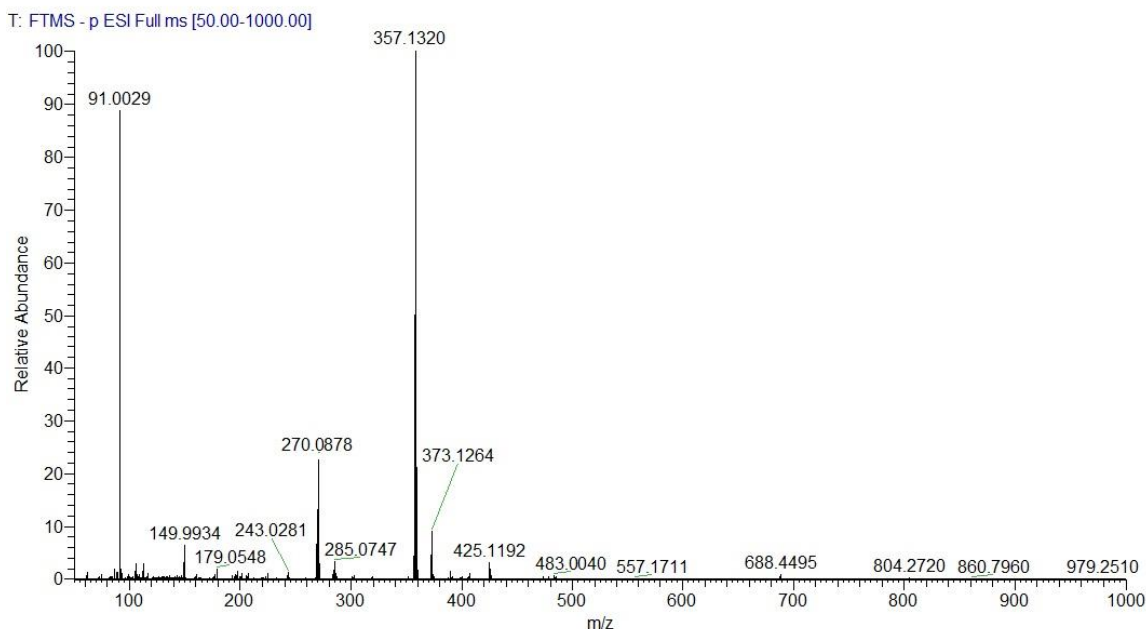
Слика 4.12.  $^1\text{H}$  NMR спектар изобутирилишиконина (2)(A) увећан део спектралне области од 1 до 1,9 ppm (B)

Интерпретација  $^{13}\text{C}$  NMR спектра (Слика 4.13.) потврдила је присуство угљеникових атома изобутирил-естарског дела молекула. На 18,9 ppm утврђено је присуство C-3' и C-4' угљеникових атома, C-2' уочен је на 33,9 ppm, док је карбонилни угљеник естарске групе C-1' примећен на значајно нижем пољу (175,7 ppm). Присуство бочног низа везаног за нафтазарински прстен потврђено је сигнаlima на ниским вредностима хемијских померања који припадају угљениковим атомима C-16, C-15, C-12, C-11 (17,9 ppm, 25,7 ppm, 32,8 ppm, 68,8 ppm), док на вишим фреквенцијама резонирају угљеници C-13 и C-14 (117,7 ppm и 135,9 ppm). Из приказаних вредности хемијских померања примећено је значајно померање ка нижем пољу (већој вредности хемијског померања) за угљеников атом C-11, као последица увођења естарске групе у бочни низ нафтохинонског система. Угљеникови атоми карбонилних група из нафтазаринског прстена (C-1 и C-4) примећени су на 176,7 ppm и 178,3 ppm, док су угљеникови атоми за које су везане хидроксилне групе (C-8 и C-5) дали сигнале на нешто вишим пољима и то на 166,6 ppm и 167,3 ppm. На нижим вредностима хемијских померања идентификовано је присуство C-9 и C-10 угљеника који се налазе у чвору нафтазаринског језгра (111,4 ppm и 111,8 ppm), док преостали атоми угљеника овог језгра резонирају на вишим фреквенцијама.



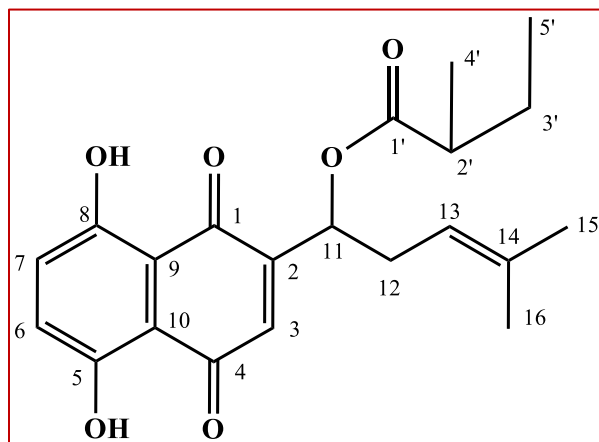
Слика 4.13.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар изобутирилишиконина (2)

Масени спектар високе резолуције изобутирилшиконина дао је квазимолекулски јон  $[M-H]^-$  на 357,1320 m/z, а спектар је представљен на *Слика 4.14.* Добијени квазимолекулски јон одговара једињењу бруто формуле  $C_{20}H_{21}O_6$  (m/z 357,1338) са грешком мерења од -3,654 ppm.



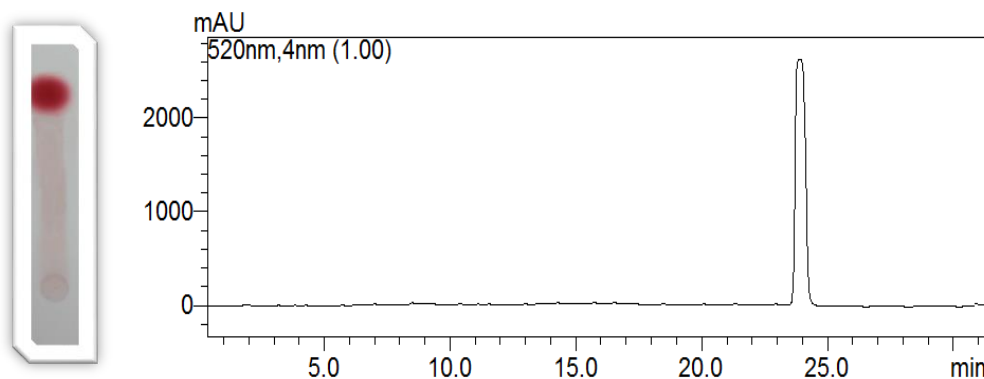
*Слика 4.14.* Масени спектар високе резолуције изобутирилшиконина (2)

#### 4.2.3. $\alpha$ -Метилбутирилшиконин (3)



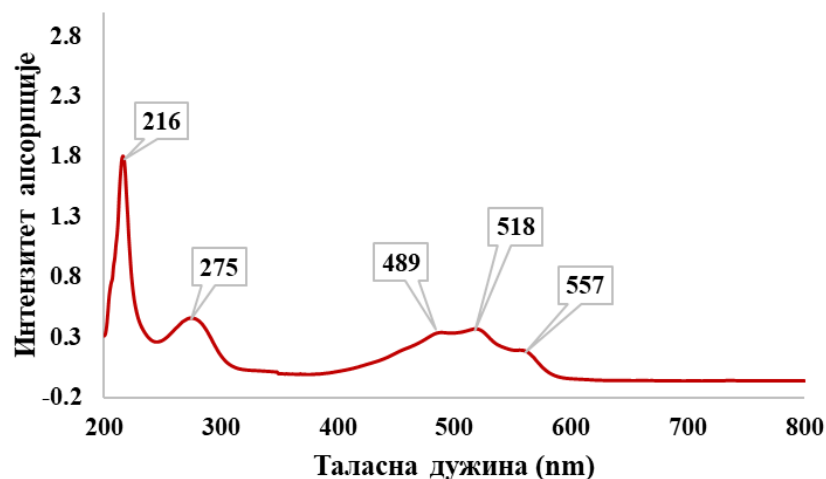
$\alpha$ -Метилбутирилшиконин (3) [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил-2-метилбутаноат], изолован је у облику црвено-љубичасте чврсте супстанце. Употребом растварачке смеше петрол етар:етил ацетат (90:10 v/v) најпре је урађена аналитичка TLC анализа у сврху одређивања степена чистоће изолованог једињења. На *Слика 4.15.* представљен је добијени хроматограм са кога се јасно види да је једињење изоловано без примеса других нафтохинонских

деривата. HPLC анализом утврђен је висок степен чистоћа изолованог молекула, а одговарајући хроматограм представљен је на *Слика 4.15.*, при чему је за ретенционо време овог деривата нафтохинона нађено да износи  $RT=23,887$  min.



*Слика 4.15.* TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3)

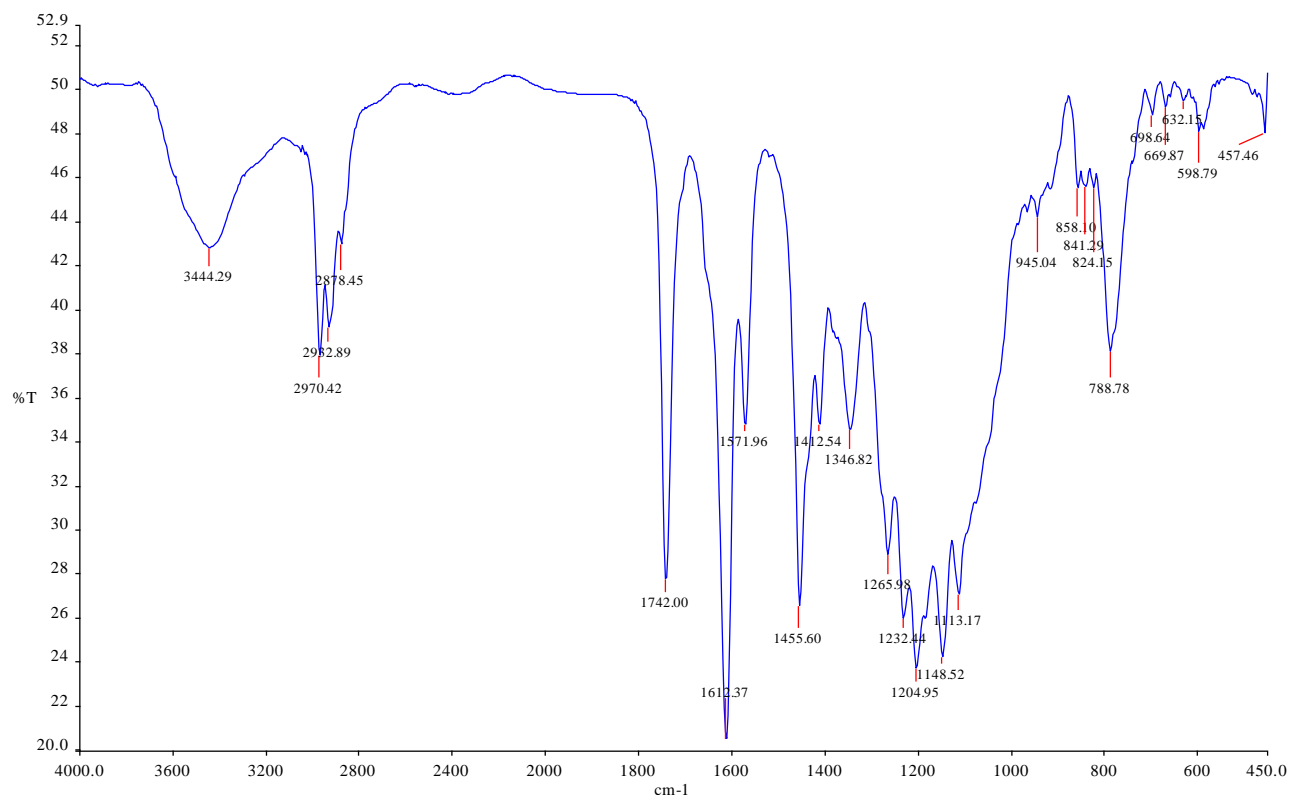
UV-Vis спектар  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3) (*Слика 4.16.*) окарактерисан је истим бројем апсорпционих максимума као претходно анализирани спектри. У ултраљубичастој области јављају се два апсорпциона максимума на 216 nm и 275 nm, док су у видљивом делу спектра примећена три апсорпциона максимума на 489 nm, 518 nm и 557 nm.



*Слика 4.16.* UV-Vis спектар  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3)

Присуство различитих функционалних група у молекулу  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3) утврђено је применом инфрацрвене спектроскопије. Добијени IR спектар представљен је на *Слика 4.17.* Присуство хидроксилних група потврђено је широком траком у области

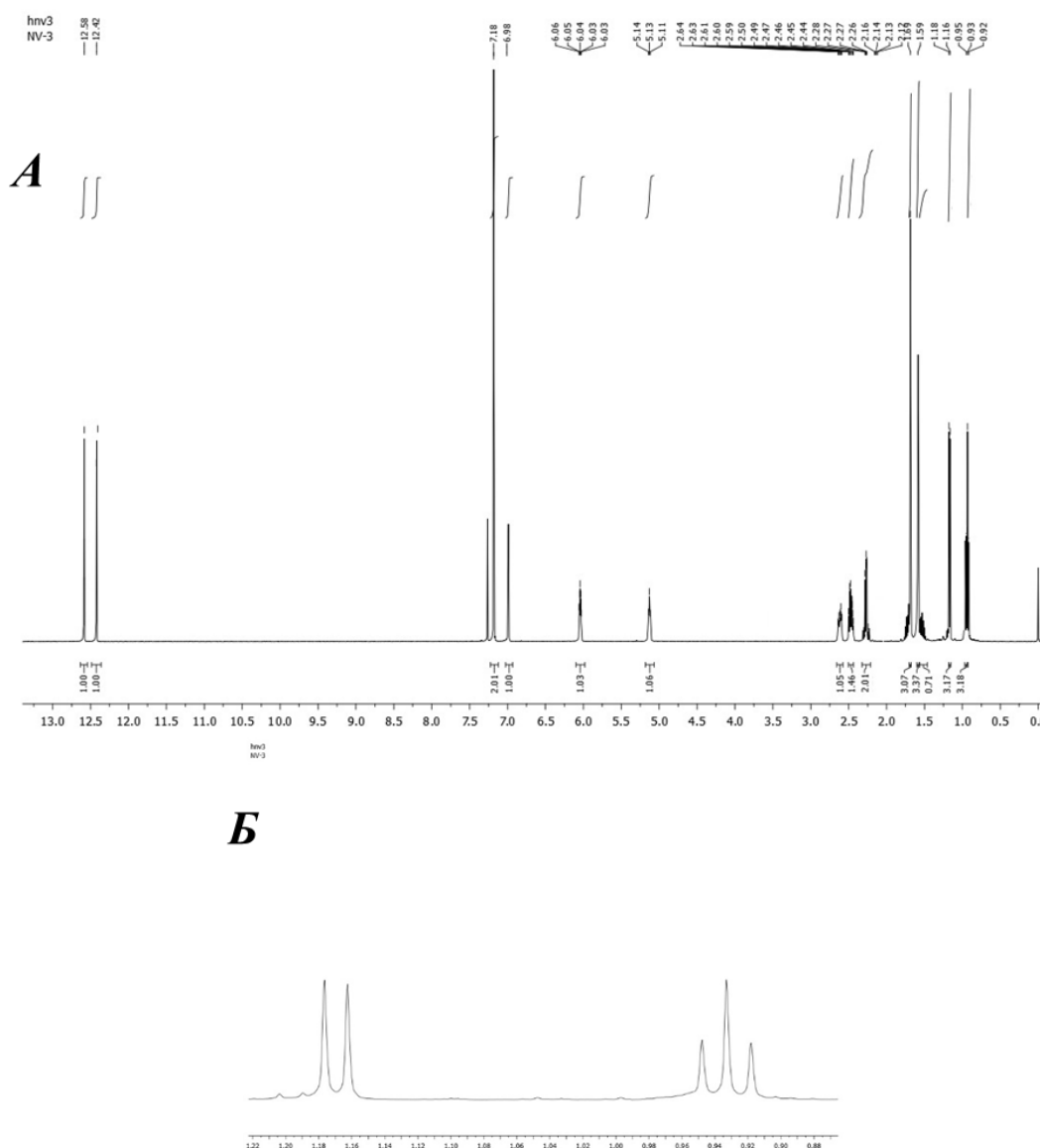
од  $3660\text{--}3622\text{ cm}^{-1}$ . Траке на  $1610\text{ cm}^{-1}$ ,  $1571\text{ cm}^{-1}$  и  $1455\text{ cm}^{-1}$  одговарају скелетним вибрацијама C=C веза нафтазаринског језгра. Вибрација C=O групе естарског дела молекула лоцирана је на  $1742\text{ cm}^{-1}$ , док су валенционе вибрације C-O веза уочене на  $1232\text{ cm}^{-1}$ ,  $1204\text{ cm}^{-1}$ ,  $1148\text{ cm}^{-1}$  и  $1113\text{ cm}^{-1}$ .



Слика 4.17. IR спектар  $\alpha$ -метилбутирилишконина (3)

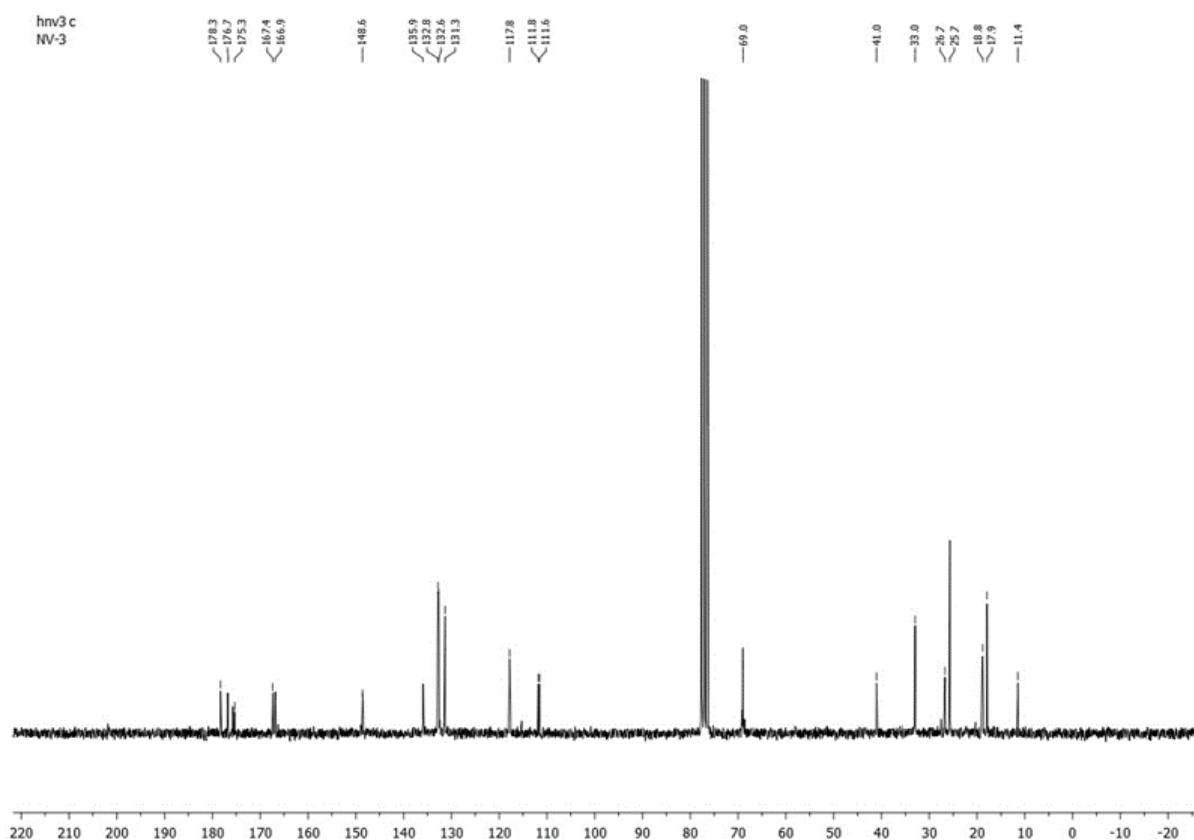
Анализом  $^1\text{H}$  NMR спектра најпре су уочени триплет интеграла 3 на 0,93 ppm константе спрезања  $J=7,3\text{ Hz}$  и дублет истог интеграла на 1,17 ppm константе спрезања  $J=7,0\text{ Hz}$  који одговарају протонима на  $\text{sp}^3$  хибридованим угљеницима C-4' и C-5' из  $\alpha$ -метилбутирил-естарског дела молекула (Слика 4.18.). Преостали протони овог дела молекула лоцирани су на 1,53 ppm у облику мултиплета са интегралом 2 везани за C-3', и протон на 2,27 ppm у облику мултиплета везан за C-2'. Два синглета са интегралима 3 на 1,59 ppm и 1,69 ppm одговарају протонима из метил група (H-16 и H-15) везаних за C-14 угљеников атом. Као и у претходно окарактерисаним протонским спектрима деоксишконина и изобутирилшконина, и у спектру овог молекула присутни су сигнали гемаалних протона H-12a и H-12b у облику мултиплета интеграла 1 на 2,47 ppm и 2,61

ppm. Преостали протони бочног низа везани за нафтазаринско језгро уочени су у облику триплета интеграла 1 и константе спрезања  $J=7,0$  Hz (H-13), и у облику дублет-дублета интеграла 1 и константи спрезања  $J=7,4$  Hz и  $J=4,3$  Hz (H-11) на 5,13 ppm и 6,04 ppm. Протони везани за скелетне угљеникове атоме језгра нафтазарина H-6 и H-7 лоцирани су на 7,18 ppm у облику синглета интеграла 2, док је H-3 окарактерисан присуством сигнала на 6,98 ppm истог облика интеграла 1. Примећено је и присуство две хидроксилне групе на основу сигнала у облику синглета интеграла 1 на 12,42 ppm и 12,58 ppm (C-5-OH и C-8-OH).



Слика 4.18.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (3)(A) увећан део спектралне области од 0,8 до 1,2 ppm (B)

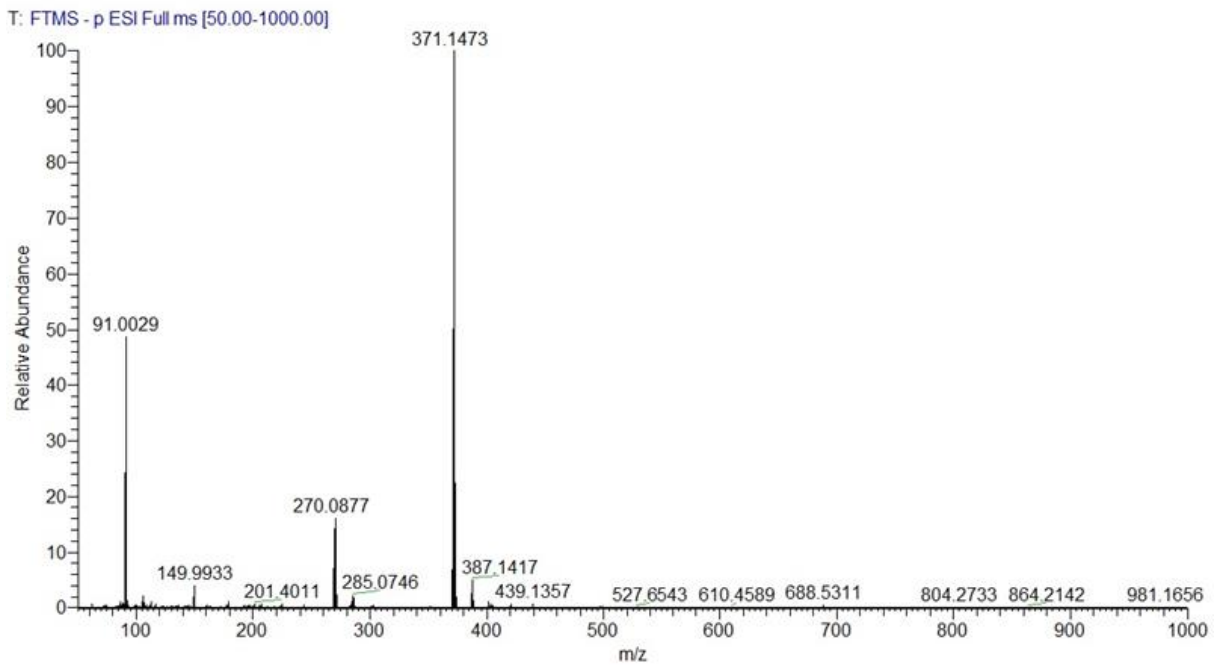
На основу анализе  $^{13}\text{C}$  NMR спектра потврђено је присуство угљеникових атома  $\alpha$ -метилбутирил-естарског дела молекула на 11,4 ppm, 18,8 ppm, 26,7 ppm и 41,0 ppm од C-4', C-5', C-3' и C-2', док је сигнал карбонилне групе из естра C-1' уочен на знатно вишој вредности хемијског померања (175,3 ppm) (Слика 4.19.). Угљеници бочног низа нафтазаринског језгра C-16, C-15, C-12, C-11, уочени су на вишим пољима (17,9 ppm, 25,7 ppm, 33,0 ppm и 69,0 ppm) док су C-13 и C-14 лоцирани на знатно вишим вредностима хемијског померања (117,8 ppm и 135,9 ppm). Угљеникови атоми карбонилних група из нафтазаринског прстена (C-1 и C-4) лоцирани су на 176,7 и 178,3 ppm, док су угљеникови атоми за које су везане хидроксилне групе (C-8 и C-5) дали сигнале на нешто нижим вредностима хемијских померања (166,9 ppm и 167,4 ppm). Остали угљеникови атоми нафтазарина уочени су на нижим пољима.



Слика 4.19.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар  $\alpha$ -метилбутирилишконина (3)



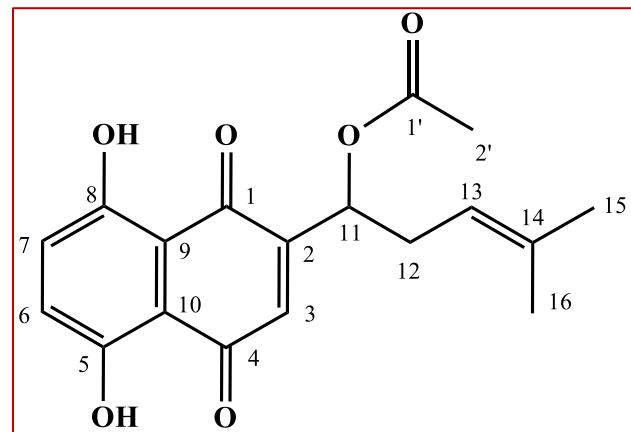
Масени спектар високе резолуције изобутирилшиконина дао је квазимолекулски јон  $[M-H]^-$  на 371,1473 масених јединица, и спектар је представљен на *Слика 4.20.* Добијени квазимолекулски јон одговара једињењу бруто формуле  $C_{21}H_{23}O_6$  ( $m/z$  371,1495) са грешком мерења од -4,405 ppm.



*Слика 4.20.* Масени спектар високе резолуције  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (**3**)

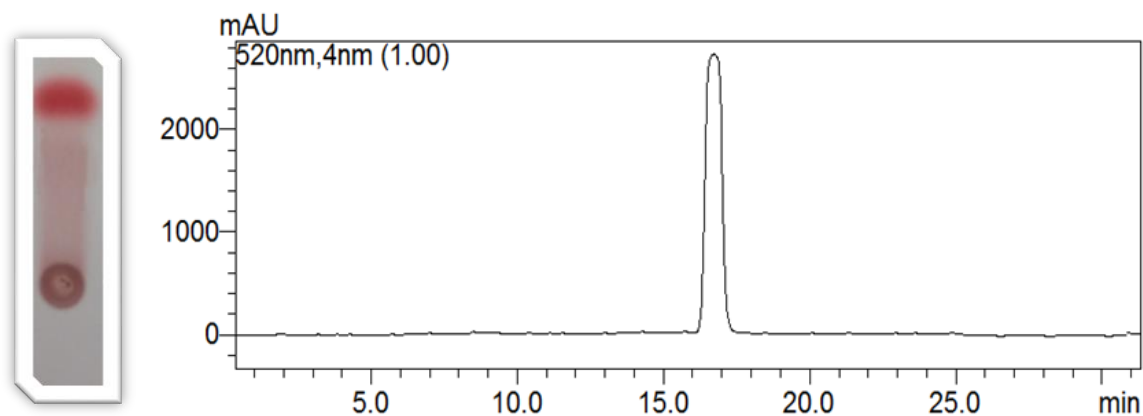
#### 4.2.4. Ацетилшиконин (**4**)

Ацетилшиконин (**4**) [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил ацетат] је изолован као црвено-љубичаста чврста супстанца. Степен чистоће изолованог једињења најпре је испитан аналитичком танкослојном хроматографијом применом већ поменуте



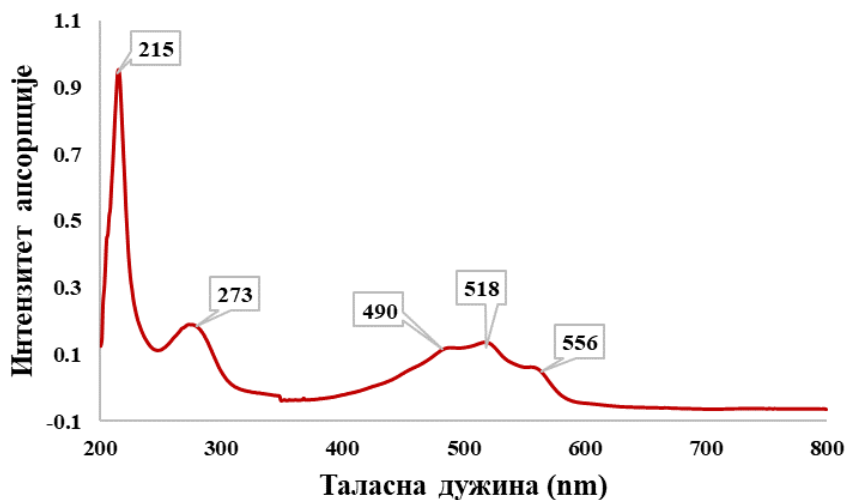
смеше за елуирање, а одговарајући хроматограм је представљен на *Слика 4.21.* Присуство једне мрље указује на одсуство других деривата нафтохинона. Након аналитичке TLC

анализе молекула је подвргнут и HPLC анализи, а добијени хроматограм је представљен на *Слика 4.21.* Присуство једног пика на хроматограму указује на високи степен чистоће изолованог једињења (RT=16,745 min).



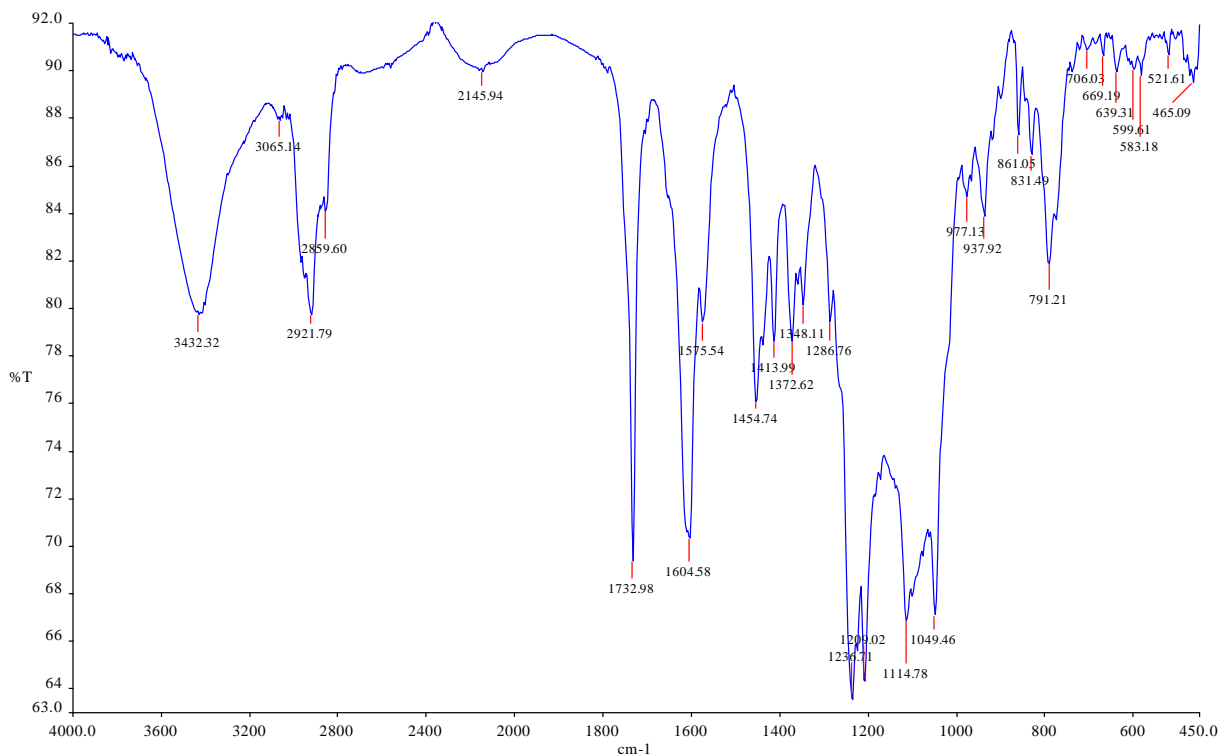
*Слика 4.21.* TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми ацетишликонина (4)

Структурна карактеризација изолованог нафтохинонског деривата прво је извршена UV-Vis спектроскопијом. Добијени спектар представљен је на *Слика 4.22.* и показује исти број апсорпционих максимума као и одговарајући спектри за претходно описана једињења. У ултраљубичастој области спектра електромагнетног зрачења јављају се два апсорпциона максимума на 215 nm и 273 nm, док су у видљивом делу спектра присутна три апсорпциона максимума на 490 nm, 518 nm и 556 nm.



*Слика 4.22.* UV-Vis спектар ацетишликонина (4)

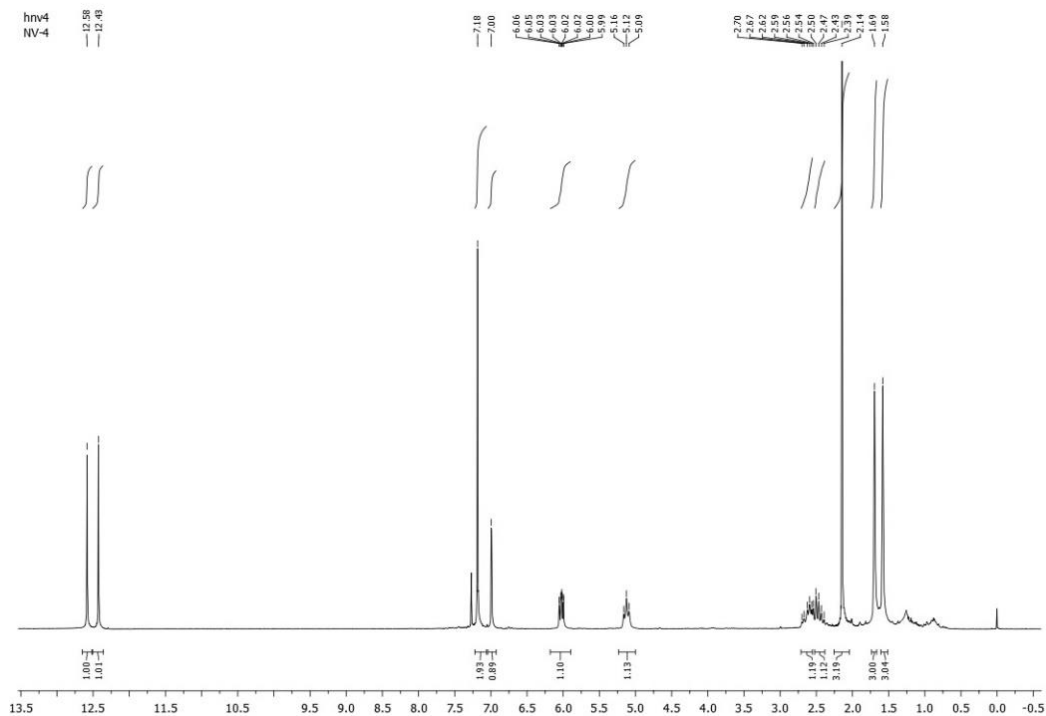
Интерпретација IR спектра ацетилшиконина (Слика 4.23.) указала је на присуство хидроксилних група у области  $3650\text{--}3620\text{ cm}^{-1}$ . Присуство карбонилне групе окарактерисано је оштром, интензивном траком на  $1732\text{ cm}^{-1}$ . Валенционе вибрације С-О веза идентификоване су на  $1236\text{ cm}^{-1}$ ,  $1209\text{ cm}^{-1}$ ,  $1114\text{ cm}^{-1}$  и  $1049\text{ cm}^{-1}$ , док су скелетне валенционе вибрације језгра нафтазарина дале траке на  $1604\text{ cm}^{-1}$ ,  $1575\text{ cm}^{-1}$  и  $1454\text{ cm}^{-1}$ .



Слика 4.23. IR спектар ацетилшиконина (4)

На Слика 4.24. представљен је  $^1\text{H}$  NMR спектар ацетилшиконина. Анализом спектралних података утврђено је присуство протона Н-16 и Н-15 у облику два синглета интеграла 3 који одговарају метил групама везаним за С-14 угљеников атом на 1,58 ppm и 1,69 ppm. Протони метил групе везани за карбонилни угљеник естарског дела молекула Н-2' резонирају у форми синглета интеграла 3 на 2,14 ppm. Два мултиплета на 2,46 ppm и 2,61 ppm са интегралима вредности 1 одговарају хемијском померању гемаиналних протона Н-12а и Н-12b. Остали протони бочног низа нафтазаринског језгра лоцирани су на 5,12 ppm у облику триплета интеграла 1 са константом спрезања од  $J=6,1\text{ Hz}$  (Н-13), и на 6,02 ppm у облику дублет-дублета интеграла 1 са константама спрезања од  $J=7,4\text{ Hz}$  и  $J=4,2\text{ Hz}$  (Н-11).

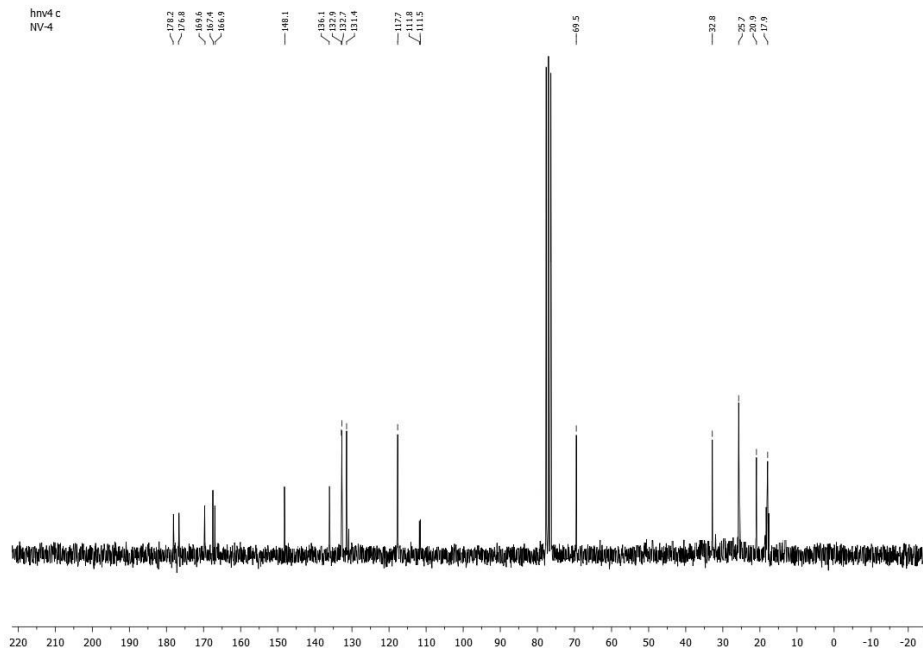
Нафтазаринско језгро садржи протоне на угљениковим атомима С-3, С-6 и С-7, а сва три су идентификована у облику синглета, при чему је Н-3 са интегралом 1 уочен на 7,00 ppm, а Н-6 и Н-7 интеграла 2 на 7,18 ppm. На знатно вишим фреквенцијама (вредностима хемијских померања) (12,43 ppm и 12,58 ppm) лоцирани су протони ОН-5 и ОН-8 у облику синглета интеграла 1.



Слика 4.24.  $^1\text{H}$  NMR спектар ацетилишиконина (4)

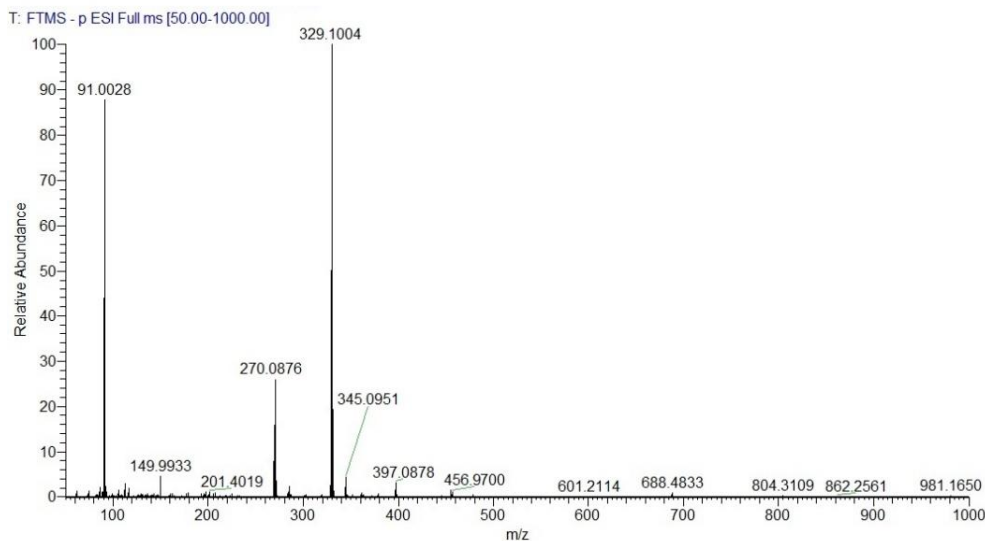
Анализом  $^{13}\text{C}$  NMR спектра (Слика 4.25.) угљеникови атоми С-16, С-15, С-12, С-11, С-13 и С-14 бочног изохексенилског низа везаног за нафтазаринско језгро идентификовани су на 17,9 ppm, 25,7 ppm, 32,8 ppm, 69,5 ppm, 117,7 ppm и 136,1 ppm. Угљеников атом С-2' метил групе естарског дела молекула уочен је на 20,9 ppm, док се С-1' карбонилни угљеник примећује на знатно нижем пољу (169,6 ppm). Чворни угљеникови атоми нафтазаринског језгра С-9 и С-10 уочени су на хемијским померањима од 111,5 ppm, односно 111,8 ppm. Остали угљеникови атоми скелета нафтазарина С-2, С-6, С-7 и С-3 резонирају на вишим фреквенцијама (131,4 ppm, 132,7 ppm, 132,9 ppm и 148,1 ppm). Угљеникови атоми С=О група из нафтазаринског прстена (С-1 и С-4) дају сигнале на 176,8 ppm и 178,2 ppm, док су

угљеникови атоми за које су везане хидроксилне групе (C-8 и C-5) дали сигнале на нешто нижим вредностима хемијских померања (166,9 ppm и 167,4 ppm).



Слика 4.25.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар ацетилшиконина (4)

На Слика 4.26. представљен је масени спектар високе резолуције ацетилшиконина. Квазимолекулски јон  $[\text{M}-\text{H}]^-$  је идентификован на 329,1004 m/z и одговара једињењу бруто формуле  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_6$  (m/z 329,1025) са грешком мерења од -4,663 ppm.

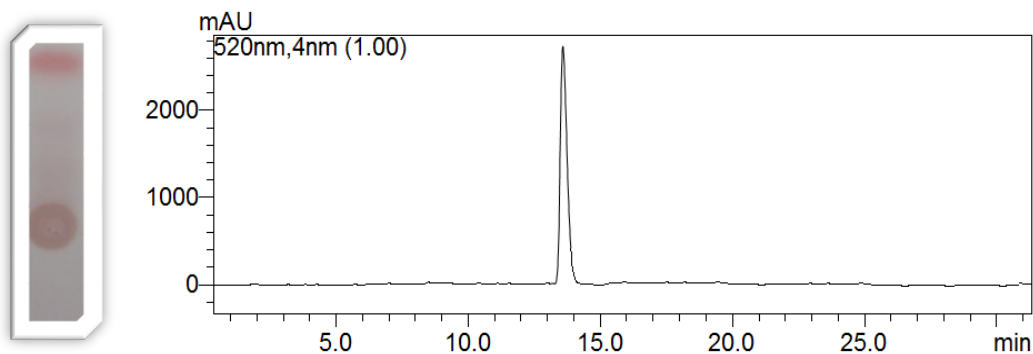
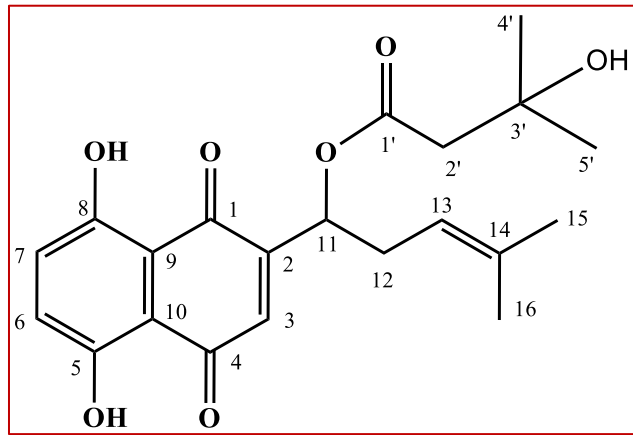


Слика 4.26. Масени спектар високе резолуције ацетилшиконина (4)

4.2.5.  $\beta$ -Хидроксиизовалерилшиконин (5)

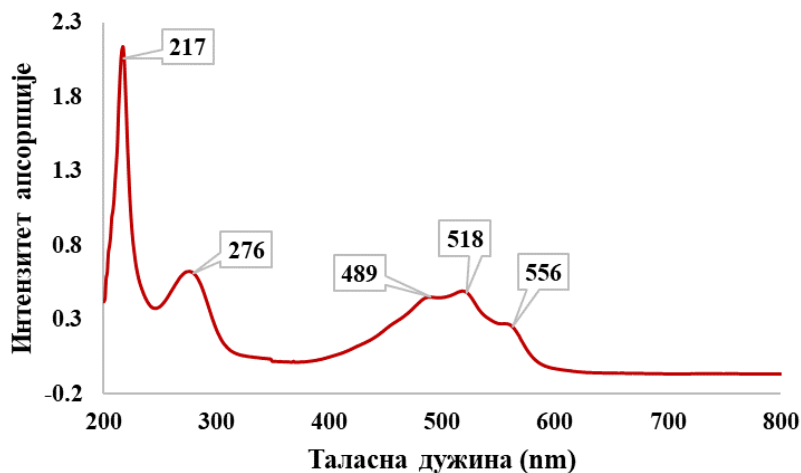
$\beta$ -Хидроксиизовалерилшиконин (5) [(+)-1-(5,8-дихидрокси-1,4-диоксо-1,4-дихидронафтален-2-ил)-4-метилпент-3-енил-3-хидрокси-3-метилбутаноат] је

изолован као црвено-љубичаста чврста супстанца. Аналитичком танкослојном хроматографијом је најпре проверено да ли је ова супстанца изолована у одговарајућем степену чистоће. Са хроматограма добијеног употребом растварачке смеше петрол етар:етил ацетат (90:10 v/v) за елуирање (Слика 4.27.) види се присуство једне мрље, што указује на задовољавајућу чистоћу изолованог једињења. Резултати TLC анализе потврђени су и аналитичком HPLC анализом. Хроматограм добијен применом аналитичке хроматографије високих перформанси приказан је на Слика 4.27., а присуство једног пика (RT=13,895 min) указује на високи степен чистоће изолованог једињења.



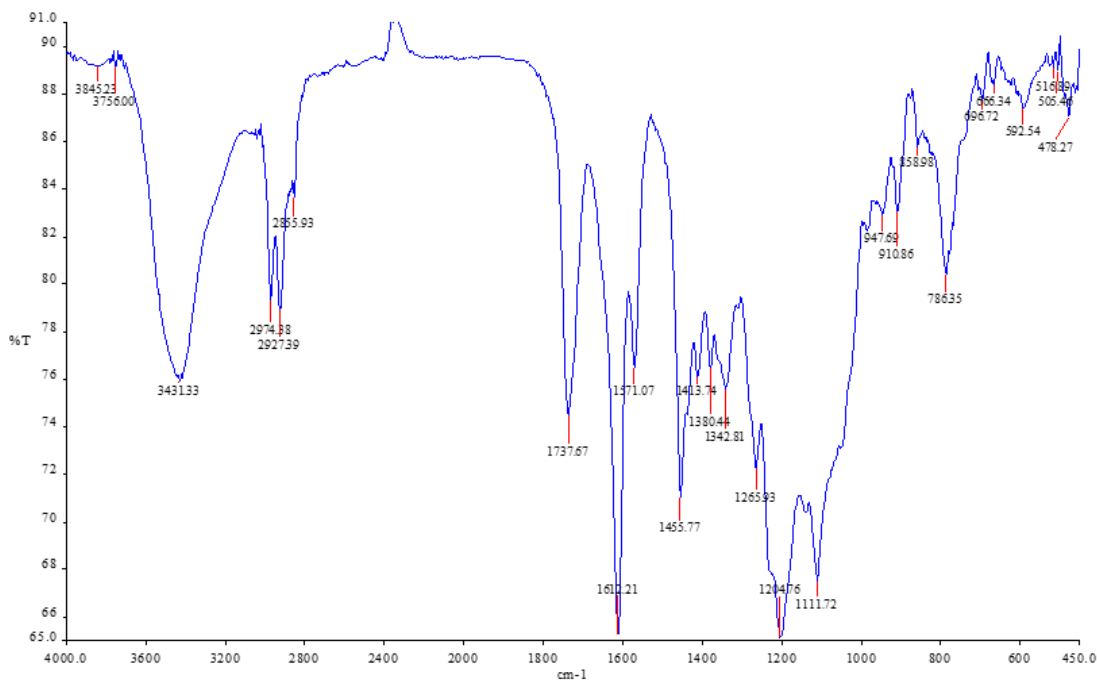
Слика 4.27. TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (5)

Електронски апсорпциони спектар  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (Слика 4.28.) окарактерисан је појавом пет апсорпционих максимума на сличним вредностима као за претходно окарактерисана једињења. У ултраљубичастом делу спектра јављају се максимума на 217 nm и 276 nm, док су у видљивом делу спектра карактеристични максимума на 489 nm, 518 nm и 556 nm, који указују на присуство нафтазаринског језгра.



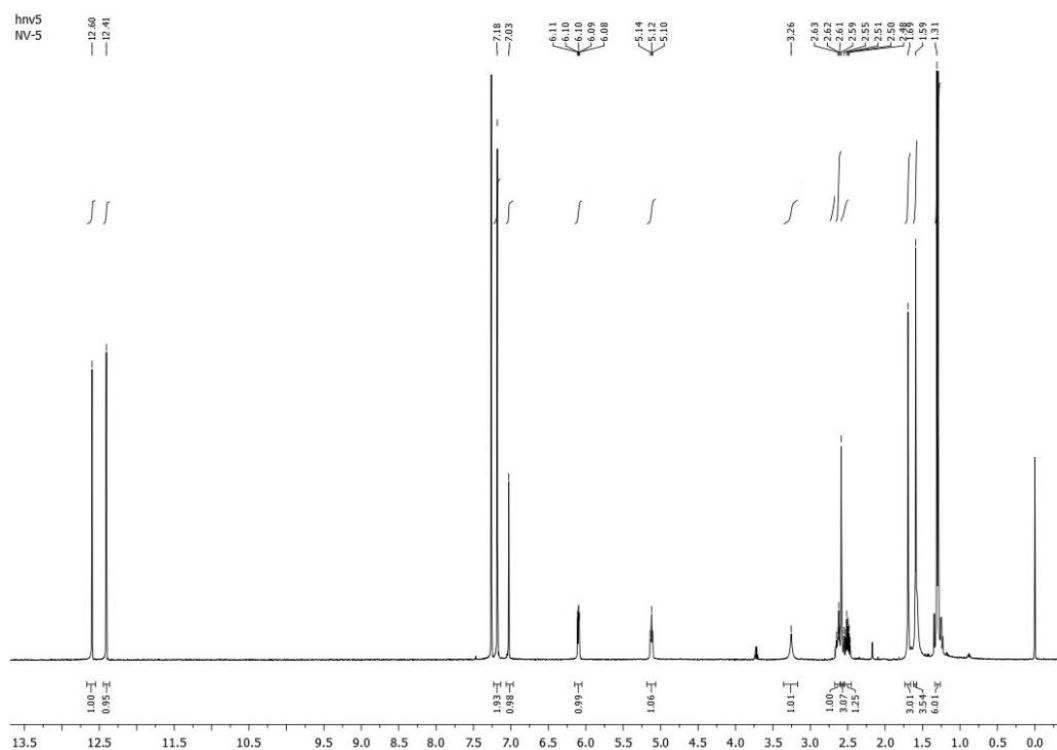
Слика 4.28. UV-Vis спектар  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5)

Спектар добијен применом инфрацрвене спектроскопије приказан је на Слика 4.29.. Присуство широке траке у области од  $3680\text{ cm}^{-1}$  до  $3620\text{ cm}^{-1}$  карактеристично је за присуство ОН група у молекулу. Оштра трака на  $1737\text{ cm}^{-1}$  указује на вибрације  $\text{C}=\text{O}$  везе естарске групе. Серија трака на  $1612\text{ cm}^{-1}$ ,  $1571\text{ cm}^{-1}$  и  $1455\text{ cm}^{-1}$  одговара скелетним вибрацијама нафтазаринског језгра у молекулу, док је серија трака на  $1264\text{ cm}^{-1}$ ,  $1204\text{ cm}^{-1}$ ,  $1154\text{ cm}^{-1}$  и  $1111\text{ cm}^{-1}$  карактеристика валенционих вибрација  $\text{C}-\text{O}$  веза.



Слика 4.29. IR спектар  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5)

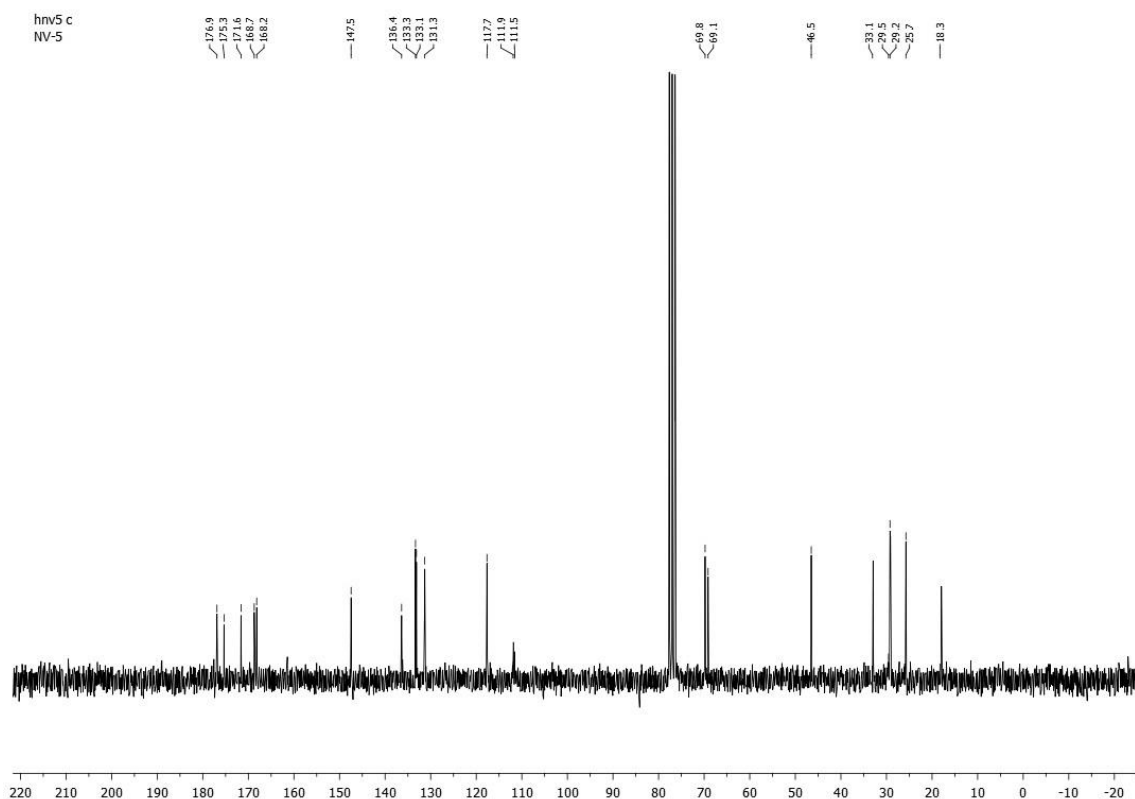
Интерпретацијом  $^1\text{H}$  NMR спектра приказаног на *Слика 4.30.* уочава се присуство сигнала на 1,31 ppm облика синглета и интеграла 6 који одговара Н-4' и Н-5' протонима метил група везаних за С-3' угљеников атом, док сигнал на 2,59 ppm истог облика, интеграла 2 карактерише Н-2' протоне. Присуство хидроксилне групе са естарског дела молекула везане за С-3' угљеник потврђено је проширеним синглетом интеграла 1 на 3,26 ppm. На хемијском померању од 1,59 ppm и 1,69 ppm облика сигнала синглета и интеграла 3 уочени су протони метил група из бочног ланца нафтазаринског језгра везани за С-14 угљеников атом (Н-15 и Н-16). На нешто нижим пољима уочени су сигнали у облику мултиплета интеграла 1 од протона Н-12а и Н-12б (2,50 ppm и 2,63 ppm). Остали протони бочног ланца нафтазаринског језгра лоцирани су на 5,12 ppm у облику триплета интеграла 1 са константом спрезања од  $J=6,7$  Hz (Н-13) и на 6,10 ppm у облику дублет-дублета интеграла 1 са константама спрезања од  $J=7,8$  Hz и  $J=4,2$  Hz (Н-11). Протони нафтазаринског језгра на угљениковим атомима С-3, С-6 и С-7 уочени су на 7,03 ppm у облику синглета, интеграла 1 (Н-3) и на 7,18 ppm истог облика интеграла 2 (Н-6 и Н-7). На значајно вишим фреквенцијама резонирају протони ОН-5 и ОН-8 у облику синглета интеграла 1 (12,41 ppm и 12,60 ppm).



*Слика 4.30.*  $^1\text{H}$  NMR спектар  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (**5**)

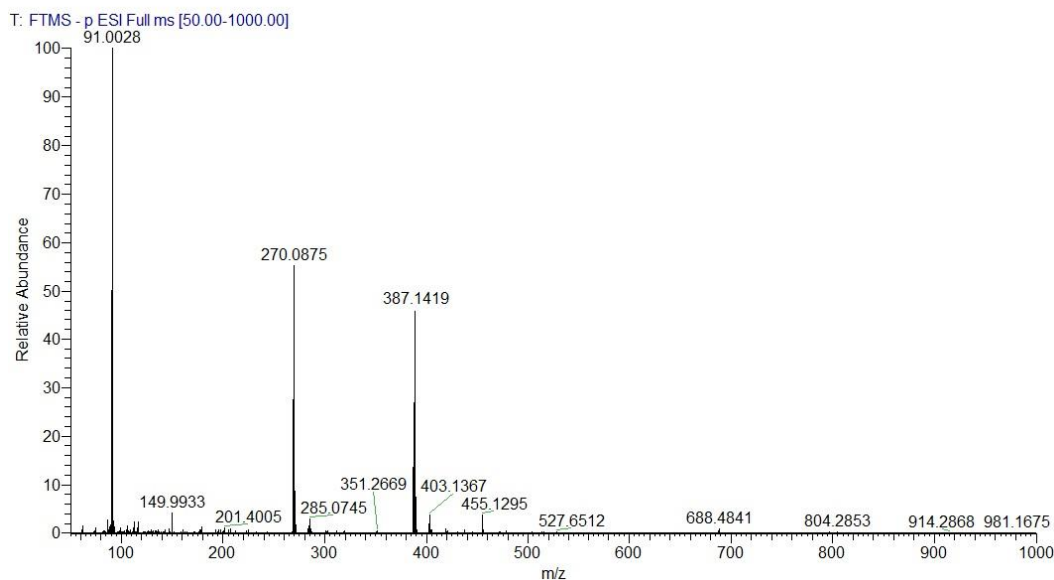


Анализа  $^{13}\text{C}$  NMR спектра (Слика 4.31.) потврдила је присуство угљеникових атома естарског дела молекула, при чему је на ниским вредностима хемијских померања потврђено присуство С-4' и С-5' угљеника метил група (29,2 ppm и 29,5 ppm), а на нешто вишим вредностима хемијских померања су уочени сигнали од С-2' и С-3' (46,5 ppm и 69,1 ppm). На знатно вишој фреквенцији идентификован је С-1' карбонилни угљеник (171,6 ppm). Атоми угљеника из изохексенилског бочног низа везаног за нафтазарин, С-16 и С-15, уочени су на 18,3 ppm и 25,7 ppm, док су С-12 и С-11 уочени на 33,1 ppm и 69,8 ppm, а на значајно нижим пољима идентификовани су С-13 и С-14 (117,7 ppm и 136,4 ppm). Угљеникови атоми за које су везане хидроксилне групе (С-8 и С-5) примећени су на 168,2 ppm и 168,7 ppm, док су карбонилни атоми угљеника из нафтазаринског језгра (С-1 и С-4) уочени на нешто вишим вредностима хемијских померања (175,3 ppm и 176,9 ppm). Угљеникови атоми нафтазаринског језгра који се налазе у чвору два ароматична прстена (С-9 и С-10) уочени су на хемијским померањима од 111,5 ppm и 111,8 ppm. Остали атоми угљеника скелета нафтазарина С-2, С-6, С-7 и С-3 резонирају на вишим фреквенцијама (131,3 ppm, 133,1 ppm, 133,3 ppm и 147,5 ppm).



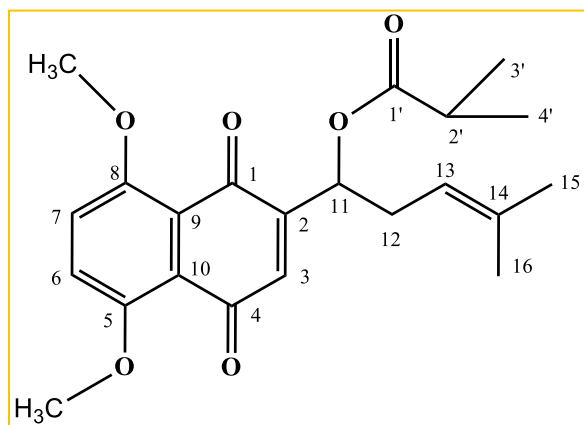
Слика 4.31.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5)

На *Слика 4.32.* представљен је масени спектар високе резолуције нафтохинонског деривата **5**. Квазимолекулски јон  $[M-H]^-$  је идентификован на 387,1419 масених јединица и одговара једињењу бруто формуле  $C_{21}H_{23}O_7$  ( $m/z$  387,1444) са грешком мерења од -4,958 ppm.



*Слика 4.32.* Масени спектар високе резолуције  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (**5**)

#### 4.2.6. 5,8-*O*-Диметил изобутирилишконин (**6**)

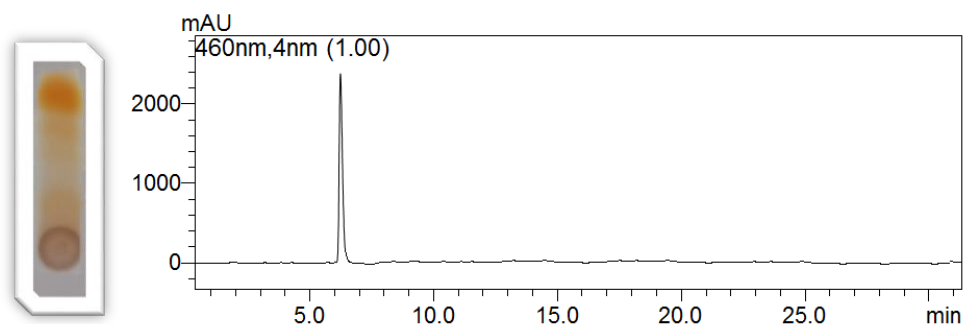


#### 5,8-*O*-Диметил изобутирилишконин (**6**)

$[(+)\text{-}1\text{-}(5,8\text{-диметокси-}1,4\text{-диоксо-}1,4\text{-дихидронафтален-}2\text{-ил)-}4\text{-метилпент-}3\text{-енил изобутират}]$  је за разлику од претходно описаних деривата нафтохинона шиконина, изолован као жута уљаста супстанца. Значајно је напоменути да је приликом израде ове дисертације 5,8-*O*-диметил

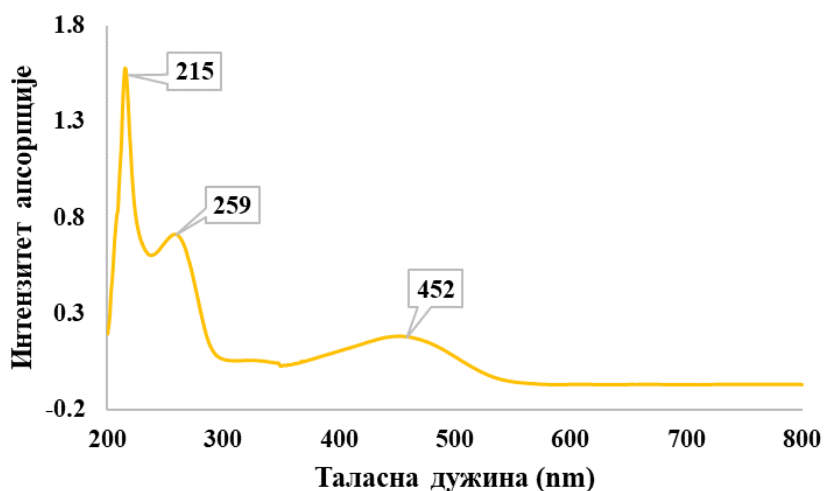
изобутирилишконин (**6**) први пут изолован. Степен чистоће изолованог једињења најпре је испитан аналитичком танкослојном хроматографијом (TLC), употребом петрол етар:хлороформ:етил ацетат (40:20:40 v/v) растварачке смеше као елуента. Одговарајући хроматограм је представљен на *Слика 4.33.*, а присуство само једне интензивне мрље

указује на задовољавајући степен чистоће једињења након изоловања. Са циљем потврде чистоће овог деривата нафтохинона примењена је аналитичка HPLC анализа. Добијени хроматограм приказан на *Слика 4.33.* указује на присуство једног пика (RT=6,057min), што потврђује високи степен чистоће изолованог једињења.



*Слика 4.33.* TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконина (6)

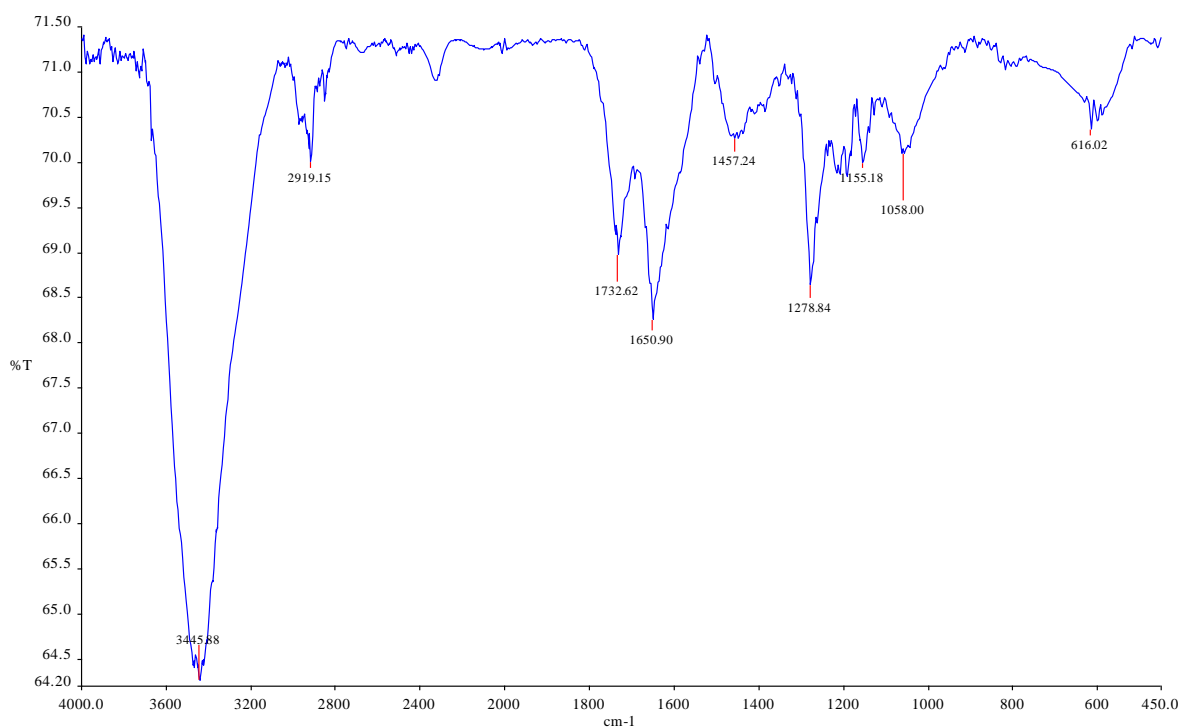
Електронски апсорпциони спектар 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконина (6) приказан је на *Слика 4.34.* У поређењу са претходно описаним спектрима изолованих једињења, у спектру 5,8-*O*-диметил деривата уочено је присуство мањег броја апсорпционих максимума. У ултраљубичастом делу спектра ситуација је слична као и код нафтохинонских деривата *I-5*, где су уочена два апсорпциона максимума на 215 nm и 259 nm, при чему је максимум на већој вредности таласне дужине хипсохромно померен у односу на исти апсорпциони максимум у спектрима једињења *I-5*.



*Слика 4.34.* UV-Vis спектар 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконина (6)

У видљивом делу спектра уочено је присуство мањег броја апсорпционих максимума у односу на спектре једињења *1-5*. Овај део електронског апсорпционог спектра је за једињење **6** окарактерисан присуством само једне хипсохромно померене траке на 452 nm.

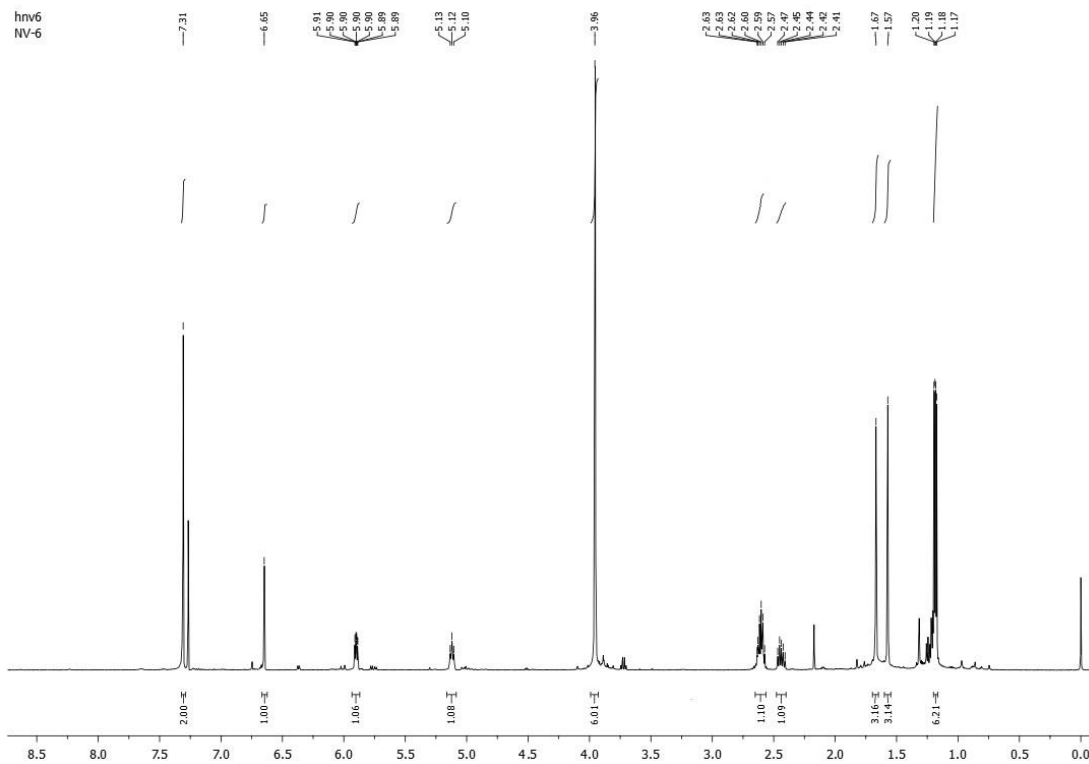
У циљу добијања информација о присуству различитих функционалних група у молекулу примењена је инфрацрвена спектроскопија, а добијени спектар је представљен на *Слика 4.35.* У поређењу са претходно описаним одговарајућим спектрима за једињења *1-5*, најпре је примећено одсуство широке и интензивне траке у области од  $3680\text{ cm}^{-1}$  до  $3160\text{ cm}^{-1}$  што указује на одсуство хидроксилних група у молекулу. На  $1732\text{ cm}^{-1}$  уочено је присуство траке која одговара валенционој вибрацији C=O везе из естарског дела молекула. Скелетне валенционе вибрације нафтазаринског језгра уочене су на  $1650\text{ cm}^{-1}$  и  $1457\text{ cm}^{-1}$ , док је присуство валенционих вибрација C-O група потврђено у виду апсорпционих трака на  $1155\text{ cm}^{-1}$  и  $1058\text{ cm}^{-1}$ .



*Слика 4.35.* IR спектар 5,8-*O*-диметил изобутирилишконина (**6**)

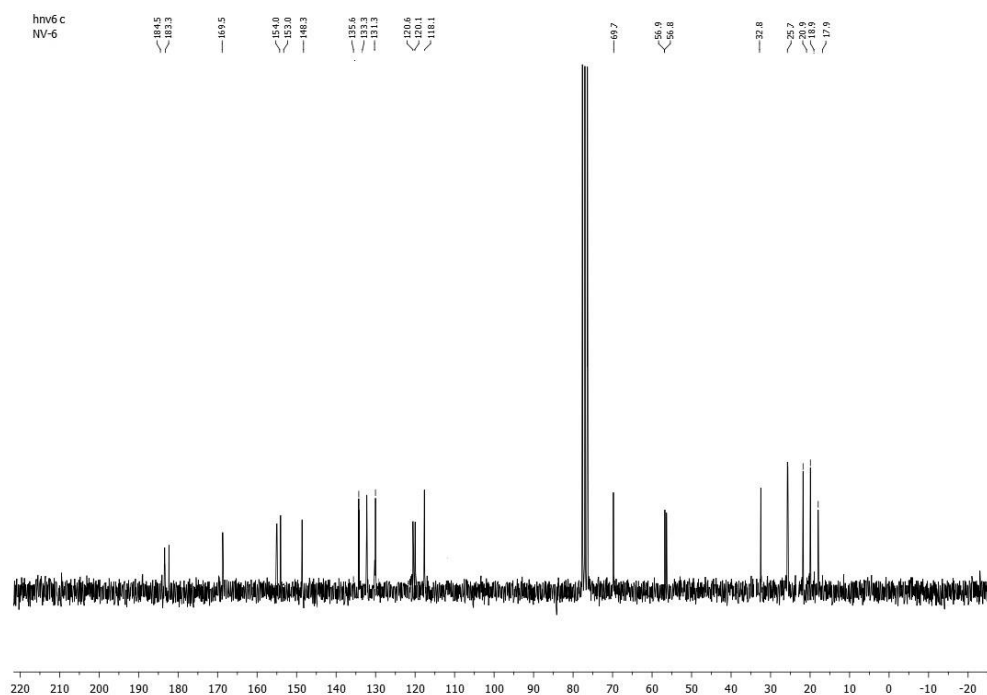
$^1\text{H}$  NMR спектар 5,8-*O*-диметил деривата изобутирилишконина приказан је на *Слика 4.36.* Интерпретацијом спектра уочено је присуство протона H-3' и H-4' у облику два

дублета са интегралима 3 и константама спрезања  $J=4,0$  Hz, на сличним хемијским померањима као и за молекул изобутирилшиконина (1,18 ppm и 1,19 ppm). Протони две метил групе везане за C-14 угљеников атом дали су сигнале у облику синглета интеграла 3 на 1,57 ppm и 1,66 ppm. Геминални, хемијско и магнетно нееквивалентни протони H-12a и H-12b лоцирани су на 2,44 ppm и 2,60 ppm облика мултиплета и интеграла 1. Остали протони бочног низа везаног за нафтазаринско језгро H-13 (сигнал облика триплета интеграла 1 и константе спрезања  $J=7,5$  Hz) и H-11 (сигнал облика дублет-дублета интеграла 1 и константама спрезања  $J=7,5$  Hz и  $J=4,5$  Hz) идентификовани су на хемијским померањима од 5,12 ppm и 5,90 ppm. За разлику од спектра изобутирилшиконина у овом спектру фигурише синглет интеграла 6 на 3,96 ppm који одговара протонима етарских метил група везаних за C-5-O и C-8-O угљенике нафтазаринског језгра, док је примећено одсуство протона хидроксилиних група на истим позицијама у молекулу на око 12,50 ppm. Протони нафтазаринског језгра H-3 (облика синглета интеграла 1), као и водоници H-6 и H-7 (облика синглета интеграла 2) уочени су на 6,65 ppm и 7,31 ppm.



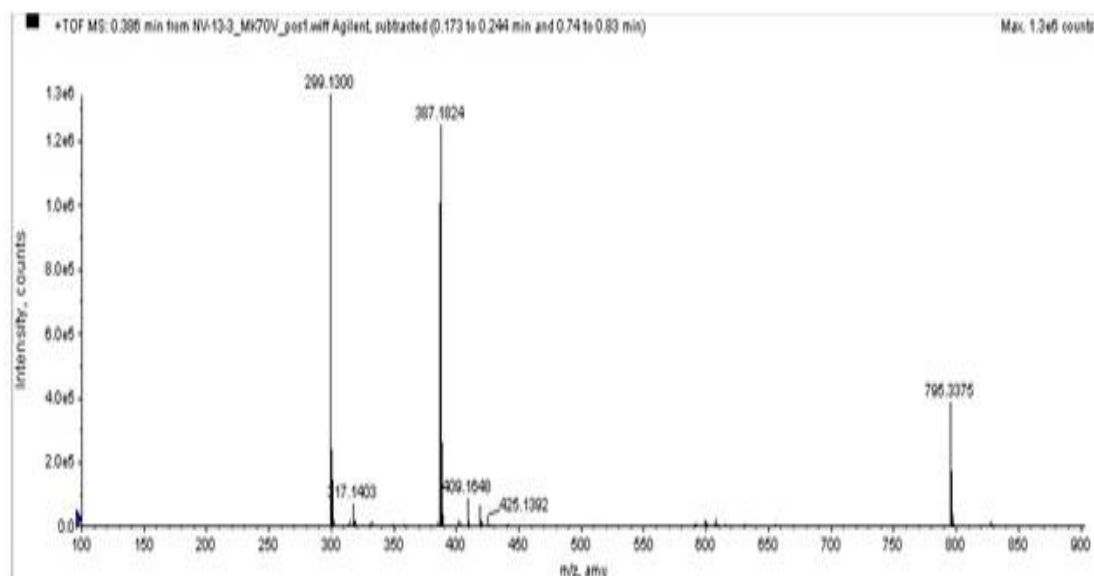
Слика 4.36.  $^1\text{H}$  NMR спектар 5,8-О-диметил изобутирилшиконина (6)

Интерпретацијом  $^{13}\text{C}$  NMR (Слика 4.37.) спектра потврђено је присуство угљеникових атома изобутирил-естарског дела молекула, при чему су C-3' и C-4' угљеникови атоми уочени на 18,9 ppm, док је C-2' уочен на 20,9 ppm, а карбонилни угљеник естарске групе C-1' примећен је на значајно нижем пољу (169,5 ppm). Угљеникови атоми бочног низа везаног за нафтазарински прстен потврђени су сигнаlima на ниским вредностима хемијских померања, и припадају угљениковим атомима C-16, C-15, C-12, C-11 (17,9 ppm, 25,7 ppm, 32,8 ppm, 69,7 ppm), док на знатно вишој фреквенцији резонирају C-13 и C-14 угљеникови атоми (118,1 ppm и 135,6 ppm). У поређењу са  $^{13}\text{C}$  NMR спектром изобутирилшиконина, у спектру његовог 5,8-О-диметил деривата примећено је присуство два додатна сигнала на 56,8 ppm и 56,9 ppm који одговарају угљеницима из  $\text{OCH}_3$  група везаним за C-8 и C-5 угљеникове атоме нафтазаринског језгра. Угљеникови атоми за које су везане  $\text{OCH}_3$  групе (C-8 и C-5) дају сигнале на нешто вишим пољима (153,0 ppm и 154,0 ppm) у поређењу са угљеницима карбонилних група нафтазаринског прстена (C-1 и C-4) примећеним на нижим пољима (183,3 ppm и 184,5 ppm). Сигнали угљеникових атома који се налазе у чвору нафтазаринског језгра C-9 и C-10 уочени су на 120,6 ppm. Остали угљеникови атоми нафтазарина показали су резонанцу на 120,1 ppm, 131,3 ppm, 133,3 ppm и 148,3 ppm (C-7, C-3, C-6 и C-2).



Слика 4.37.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар 5,8-О-диметил изобутирилшиконина (6)

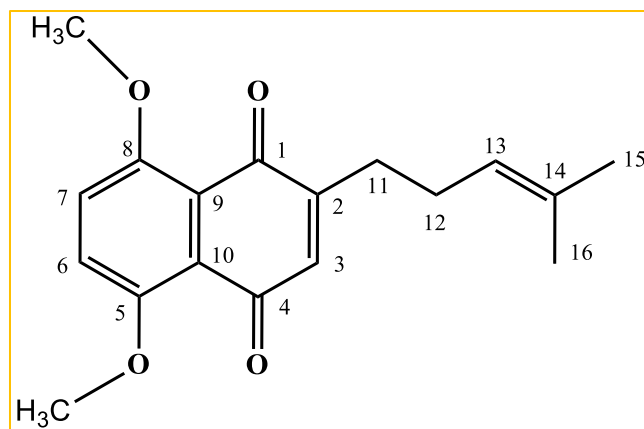
На Слика 4.38. представљен је масени спектар 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконина. Квазимолекулски јон  $[M+H]^+$  је идентификован на 387,1824  $m/z$  и одговара једињењу бруто формуле  $C_{22}H_{27}O_6$  ( $m/z$  387,1808) са грешком мерења од 4,226 ppm.



Слика 4.38. Масени спектар високе резолуције 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконина (6)

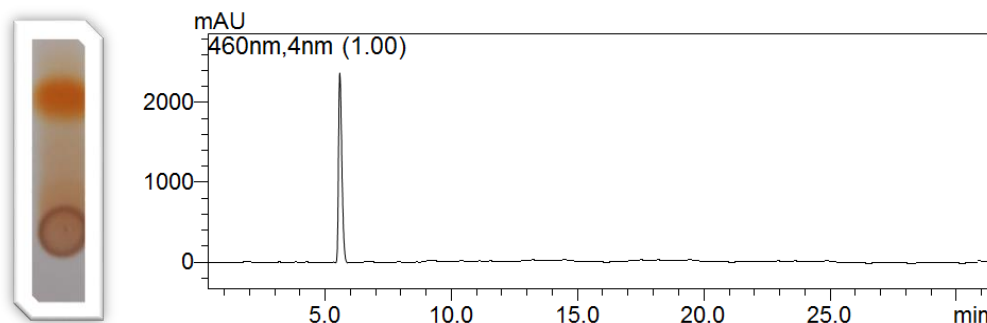
#### 4.2.6. 5,8-*O*-Диметил деоксишиконин (7)

5,8-*O*-Диметил деоксишиконин (7) (5,8-диметокси-2-(4-метилпент-3-енил)нафтален-1,4-дион) је изолован у облику тамно наранџасте вискозне супстанце. Степен чистоће 5,8-*O*-диметил деривата деоксишиконина (I) најпре је испитан аналитичком танкослојном хроматографијом (TLC) употребом



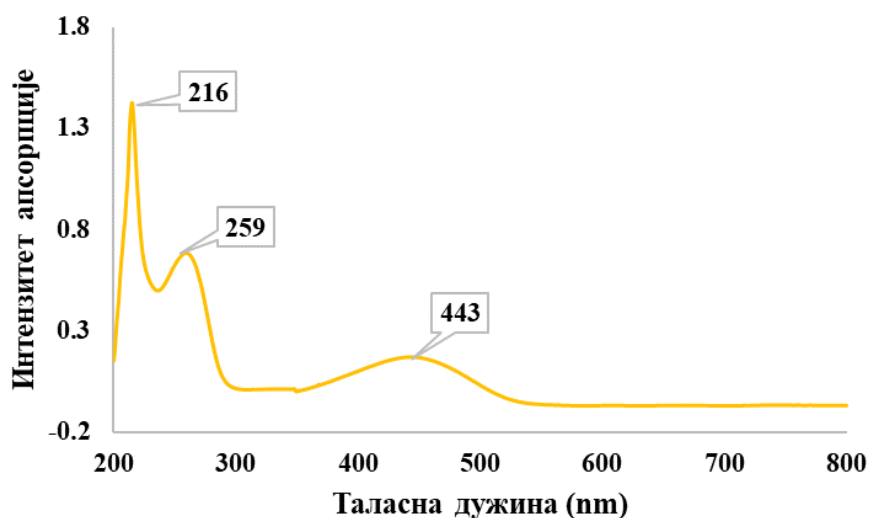
петрол етар:хлороформ:етил ацетат (40:20:40 v/v) растварачке смеше као елуента. Присуство само једне мрље на приказаном хроматограму (Слика 4.39.) указује на задовољавајући степен чистоће једињења након изоловања. Како би потврдили резултате аналитичке танкослојне хроматографије применили смо аналитичку HPLC анализу.

Добијени хроматограм приказан на *Слика 4.39.* указује на присуство једног пика (RT=5,823 min), што потврђује високи степен чистоће изолованог једињења.



*Слика 4.39.* TLC (лево) и HPLC (десно) хроматограми 5,8-*O*-диметил деоксишиконина (7)

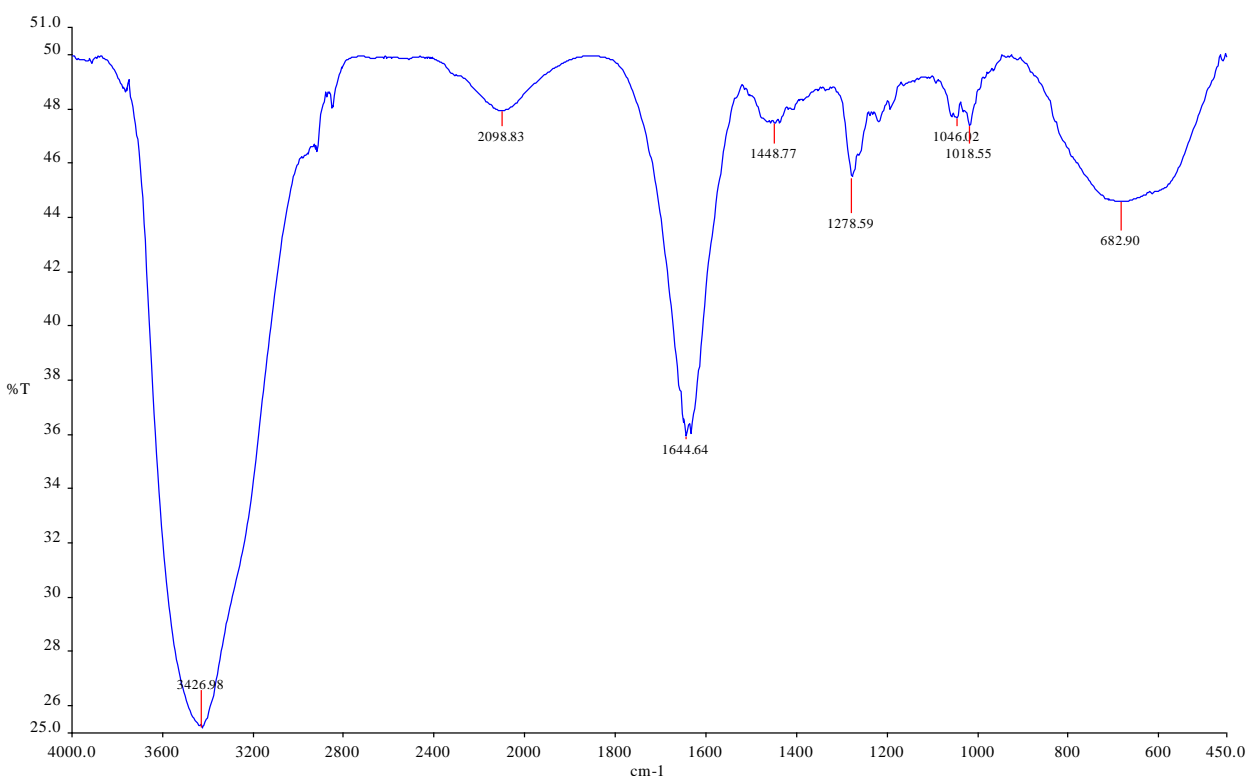
Електронски апсорпциони спектар 5,8-*O*-диметил деоксишиконина (7) (*Слика 4.40.*) показао је исти број апсорпционих максимума као и једињење 6. У ултраљубичастом делу спектра присутна су два апсорпциона максимума на 216 nm и 259 nm, као и код свих претходно описаних нафтохинона, са том разликом што је апсорпциони максимум на већој таласној дужини хипсохромно померен у односу на исти максимум код једињења 1-5. Видљиви део спектра је у сагласности са истим делом спектра описаним за једињење 6, а карактерише га један апсорпциони максимум на 443 nm.



*Слика 4.40.* UV-Vis спектар 5,8-*O*-диметил деоксишиконина (7)



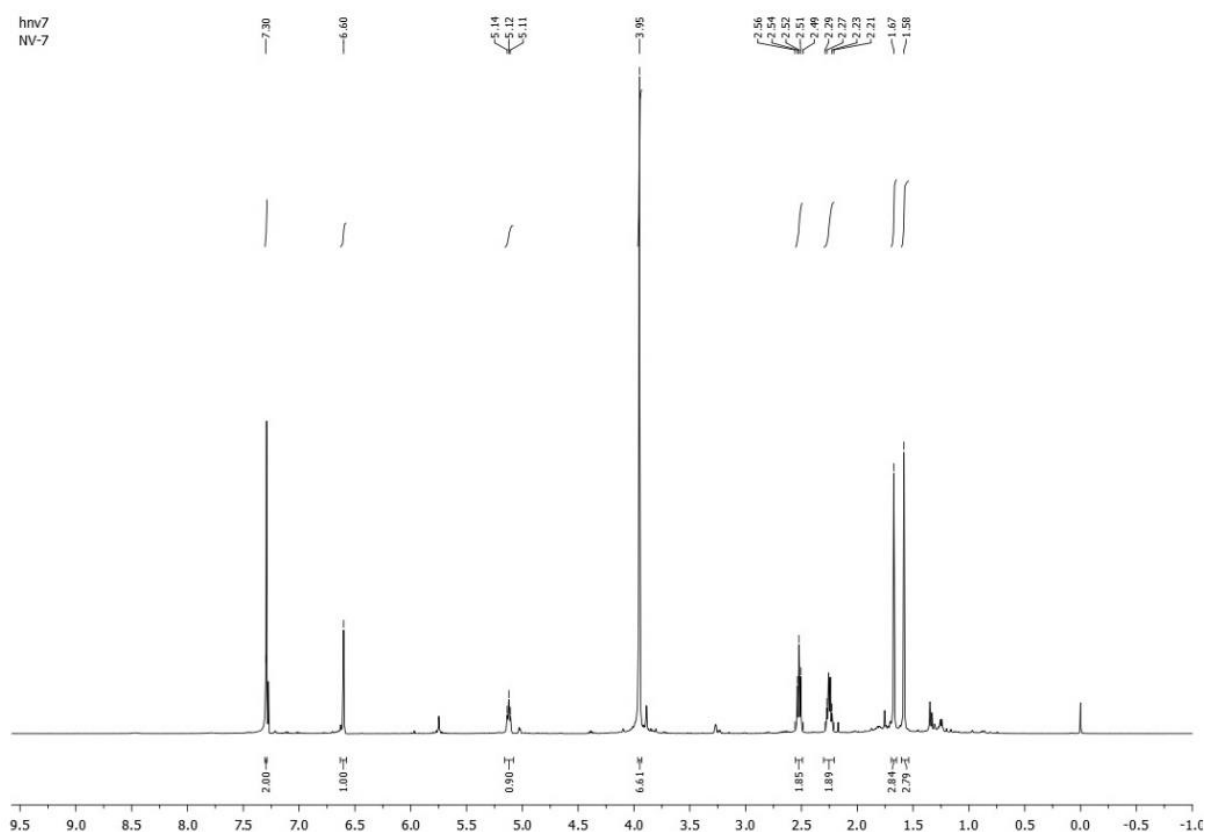
Спектар добијен применом инфрацрвене спектроскопије представљен је на *Слика 4.41.* За разлику од претходно описаних IR спектра за једињења *1-5*, а исто као у одговарајућем спектру једињења *6*, спектар *5,8-O*-диметил деоксишиконина (*7*) није показао присуство хидроксилних група у виду широке и интензивне траке у области  $3680\text{ cm}^{-1}$  до  $3160\text{ cm}^{-1}$ . Присуство скелетних валенционих вибрација нафтохинонског језгра окарактерисано је тракама на  $1644\text{ cm}^{-1}$  и  $1448\text{ cm}^{-1}$ , док је присуство C-O група потврђено валенционим вибрацијама у виду апсорпционих трака на  $1278\text{ cm}^{-1}$ ,  $1207\text{ cm}^{-1}$ ,  $1046\text{ cm}^{-1}$  и  $1018\text{ cm}^{-1}$ . Као и код спектра деоксишиконина и спектру његовог *5,8-O*-диметил деривата, примећено је одсуство траке која потиче од валенционе вибрације естарске карбонилне групе.



*Слика 4.41.* IR спектар *5,8-O*-диметил деоксишиконина (*7*)

$^1\text{H}$  NMR спектар *5,8-O*-диметил деривата деоксишиконина приказан је на *Слика 4.42.* Интерпретацијом спектра најпре су уочена два синглета на врло сличним хемијским померањима као и у спектру деоксишиконина ( $1,58\text{ ppm}$  и  $1,67\text{ ppm}$ ) са интегралима вредности 3 које одговарају протонима метил група везаних за C-14 угљеников атом. Присуство мултиплета са интегралом 1 који се налази на  $2,24\text{ ppm}$  одговара једном од

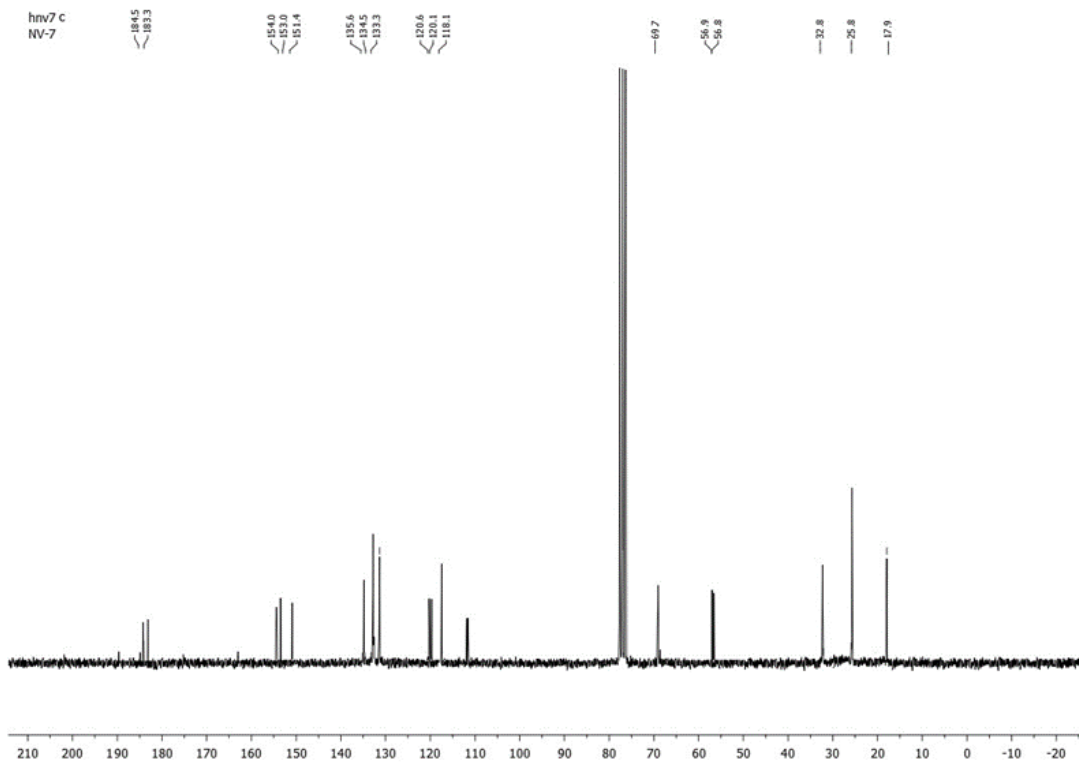
геминалних Н-12 водоника, док је мултиплет примећен на нешто нижем пољу (2,52 ppm) са интегралом 3 приписан сигналу другог геминалног протона Н-12 и протонима Н-11. Преостали протон бочног низа везаног за нафтазаринско језгро, Н-13, облика триплета интеграла 3 са константом спрезања  $J=6,4$  Hz уочен је на вишој вредности хемијског померања (5,12 ppm). Протони етарских метил група везани за С-5 и С-8 угљеникове атоме нафтазарина уочени су на 3,95 ppm у облику синглета интеграла 6. Протон Н-3 из хинонског дела нафтазаринског језгра дао је сигнал у облику синглета на 6,60 ppm, док је синглет интеграла 2 (7,30 ppm) приписан хемијском померању протона Н-6 и Н-7. Из представљеног спектра примећено је и одсуство сигнала двају хидроксилних група које се јављају у молекулу деоксишиконина.



Слика 4.42.  $^1\text{H}$  NMR спектар 5,8-О-диметил деоксишиконина (7)

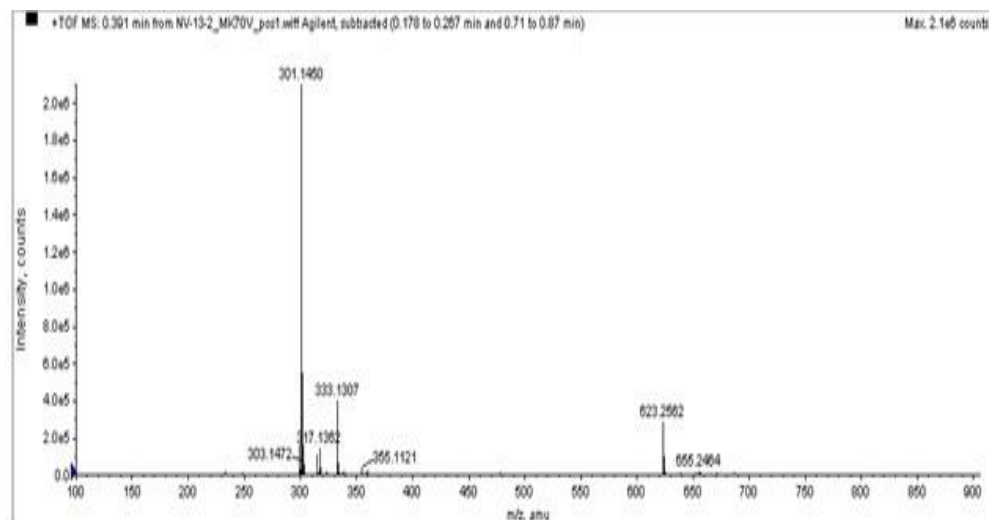
$^{13}\text{C}$  NMR спектар потврдио је присуство бочног низа везаног за нафтазаринско језгро, сигнаlima на 17,9 ppm, 25,8 ppm, 32,8 ppm, 69,7 ppm, 118,1 ppm и 135,6 ppm који одговарају С-16, С-15, С-12, С-11, С-13 и С-14 угљениковим атомима овог дела молекула

(Слика 4.43.). У поређењу са  $^{13}\text{C}$  NMR спектром деоксишиконина, у спектру његовог диметил деривата фигуришу два сигнала више на 56,8 ppm и и 56,9 ppm који одговарају хемијском померању метокси група везаних за C-8 и C-5 угљенике нафтазаринског језгра. На највишим вредностима хемијских померања примећена је резонанција угљеникових атома карбонилних група из нафтазаринског прстена (C-1 и C-4) на 183,3 и 184,5 ppm. Нафтазаринско језгро окарактерисано је и угљениковим атомима C-2, C-3, C-6, C-7, C-9 и C-10, од којих су C-7 (120,1 ppm), C-9 и C-10 (120,6 ppm) идентификовани на вишим пољима а C-6, C-3 и C-2 на нижим пољима (133,3 ppm, 134,5 ppm, и 151,4 ppm).



Слика 4.43.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар 5,8-О-диметил деоксишиконина (7)

На Слика 4.44. представљен је масени спектар једињења 7. Квазимолекулски јон  $[\text{M}+\text{H}]^+$  је идентификован на 301,1450 m/z и одговара једињењу бруто формуле  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_4$  (m/z 301,1439) са грешком мерења од 3,373 ppm.



Слика 4.44. Масени спектар високе резолуције 5,8-*O*-диметил деоксишиконин (7)

### 4.3. Квантитативна анализа изолованих нафтохинона у различитим екстрактима биљке *O. visianii* Clem

Како би утврдили који је од употребљених растварача за екстракцију (ацетон, хлороформ, етил ацетат, метанол или петрол етар) ефикаснији за изоловање нафтохинонских деривата *I-7* чија је структура представљена на *Слика 4.1.*, користили смо HPLC-PDA анализу (течну хроматографију високих перформанси уз примену детектора који региструје апсорпцију зрачења у спектралној области од 190 nm до 800 nm). За потребе HPLC анализе као стандарде смо користили претходно излована чиста једињења (*I-7*) из екстракта добијеног употребом растварачке смеше петрол етар:метилен хлорид (1:1 v/v).

Литературни подаци говоре о томе да многе биљке из фамилије Boraginaceae поред  $\alpha$ -метилбутирилшиконина (*3*) садрже и његов структурни изомер изовалерилшиконин<sup>41, 56</sup>. Како приликом изоловања није примећено присуство изовалерилшиконина, у циљу да докажемо његово одсуство (или присуство испод LOD) користили смо различите хроматографске услове, сличне литературним<sup>41</sup>. Код одабира хроматографских услова, највећи проблем представљало је раздвајање 5,8-*O*-диметил деривата (*6* и *7*) како се њихови пикови не би преклапали са пиковима других нафтохинонских деривата (*I-5*), као и постизање добре резолуције у кратком временском периоду. У том погледу, програм

градијентног елуирања представљен у Табела 3.2. (Експериментални део дисертације) задовољава све критеријуме.

За потребе квантитативног одређивања нафтохинона у испитиваним екстрактима, направљена је серија стандардних раствора нафтохинона у концентрацијама од 0,977-500  $\mu\text{g/mL}$  на основу чега су формиране калибрационе криве које показују линеарну зависност површине одговарајућег пика од концентрације једињења (Слика III.). У Табела 4.1. представљене су и једначине линеарне регресије добијене из калибрационих крива, коефицијенти корелације, граница детекције (LOD), граница квантификације (LOQ), као и опсег линеарности. Како је коефицијент корелације  $R^2 > 0,998$  можемо закључити да је линеарна корелација јако добра. Такође, представљеном методом добијен је бољи опсег линеарности у односу на литературне податке за деривате шиконина, па можемо рећи да ова метода дозвољава квантификацију једињења **1-7** за широк опсег концентрација <sup>41</sup>. Такође, значајно је напоменути да су вредности за LOD и LOQ биле су у опсегу 0,331-0,677  $\mu\text{g/mL}$  и 0,765-1,233  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>12</sup>

**Табела 4.1.** Једначине калибрационих кривих за нафтохиноне. Коефицијент корелације калибрационих кривих, граница детекције, граница квантификације и опсег линеарности

Бр.	Једначина калибрационе криве		$R^2$ (n=3)	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Опсег линеарности ( $\mu\text{g/mL}$ )
	a	b				
<b>1</b>	8881,1677 $\pm$ 51,2231	-10701,7 $\pm$ 5,6677	0,9983	0,483	0,811	0,811-500,000
<b>2</b>	11188,1111 $\pm$ 58,6687	-16634,7 $\pm$ 13,2244	0,9999	0,986	1,233	1,233-500,000
<b>3</b>	13629,1111 $\pm$ 51,3999	-39077,0 $\pm$ 21,3386	0,9993	0,331	0,765	0,765-500,000
<b>4</b>	5343,6667 $\pm$ 41,2555	36783,7 $\pm$ 19,5454	0,9933	0,356	0,861	0,861-500,000
<b>5</b>	13975,3333 $\pm$ 52,3399	-9223,7 $\pm$ 11,2121	0,9999	0,451	0,779	0,779-500,000
<b>6</b>	4665,1667 $\pm$ 49,1138	6699,7 $\pm$ 3,8899	0,9996	0,677	0,923	0,923-500,000
<b>7</b>	5026,1667 $\pm$ 55,2875	-23529,3 $\pm$ 9,3554	0,9996	0,631	0,936	0,936-500,000

Параметри једначина калибрационе криве: у-површина пика, х-концентрација анализата ( $\mu\text{g/mL}$ ) (n=3), а-нагиб праве, b-пресек праве;  $R^2$ -коефицијент корелације; LOD-граница детекције; LOQ-граница квантификације.<sup>12</sup>

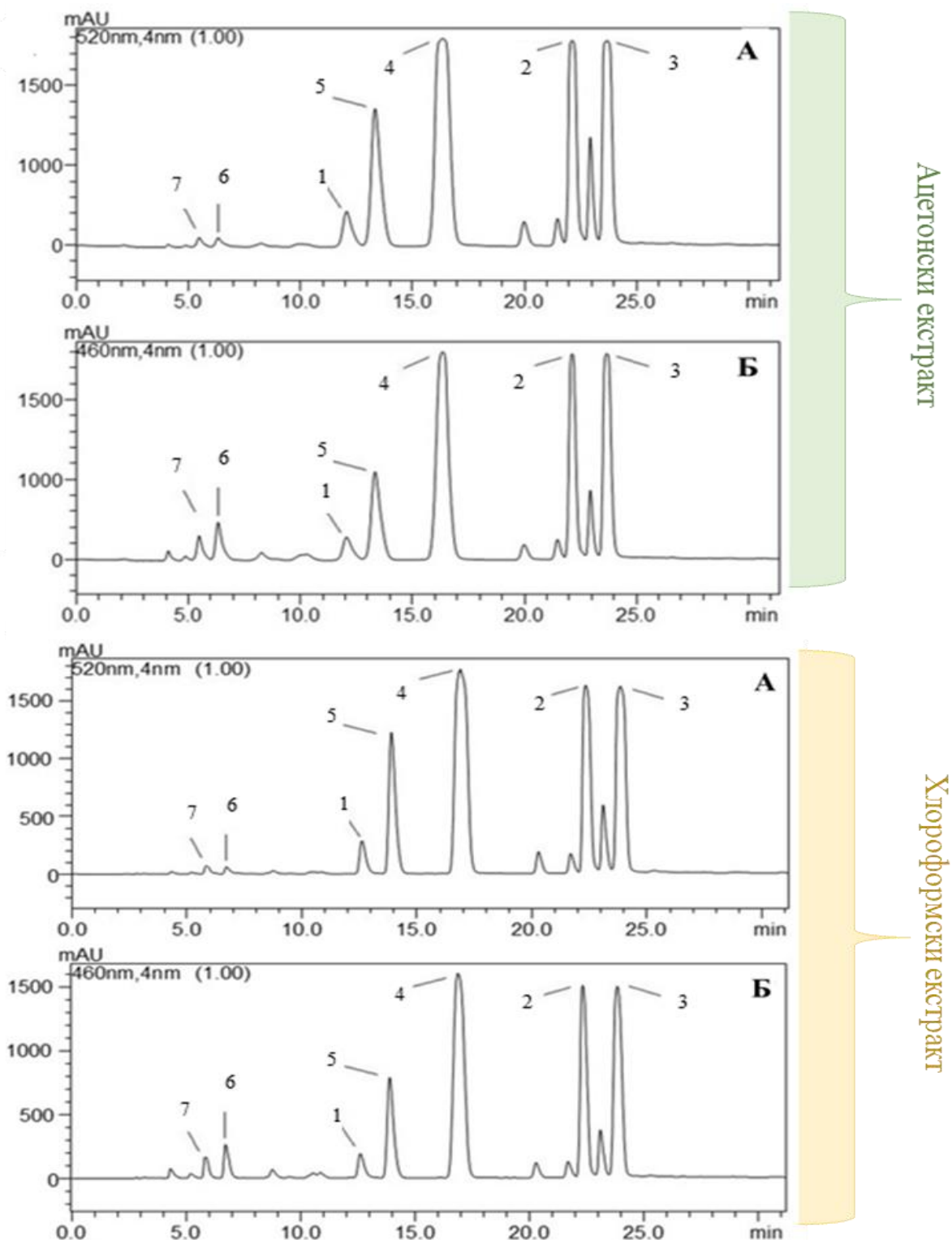
Из приложених резултата може се закључити да је приказана ефикасна HPLC-PDA методологија за раздвајање седам нафтохинонских деривата (**1-7**) у трајању од двадесет пет минута. Како диметокси деривати **6** и **7** показују јаку апсорпцију на 460 nm, а остали деривати нафтохинона (**1-5**) на 520 nm, при оптимизацији хроматографских услова у обзир

смо узели обе таласне дужине, а снимљени су и UV-Vis спектри у области од 190-800 nm. Хроматограми добијени HPLC-PDA анализом екстраката представљени су на *Слика 4.45.- Слика 4.47.*, док су у *Табела 4.2.* представљене вредности површина пикова стандардних нафтохинонских пигмената у испитиваним екстрактима. Из угла квалитативне анализе у свим испитиваним екстрактима је примећено присуство свих стандардних нафтохинона.

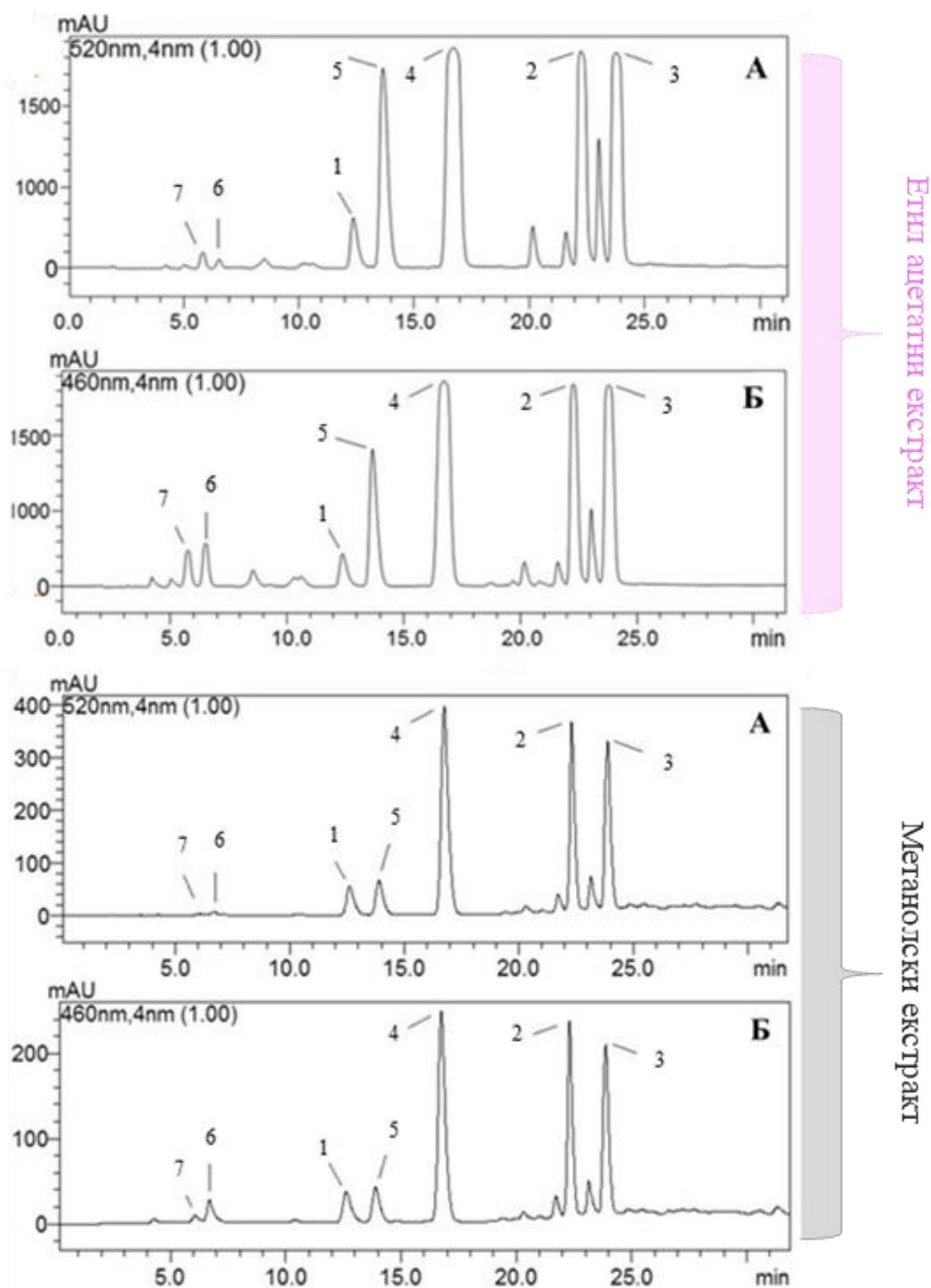
**Табела 4.2.** Површине пикова испитиваних нафтохинона представљене као средње вредности  $\pm$  SD од 3 мерења

Бр	средња вредност површине пика $\pm$ SD (n=3)				
	<sup>1</sup> ац	<sup>2</sup> хло	<sup>3</sup> ет	<sup>4</sup> мет	<sup>5</sup> пет
1	405456 $\pm$ 2395	269499 $\pm$ 1540	533092 $\pm$ 3131	267368 $\pm$ 1598	251564 $\pm$ 1507
2	3020988 $\pm$ 15916	3115824 $\pm$ 16413	3226821 $\pm$ 16995	923553 $\pm$ 4917	1876058 $\pm$ 9938
3	3877248 $\pm$ 14748	3913113 $\pm$ 14884	3459100 $\pm$ 13171	799175 $\pm$ 3140	2057761 $\pm$ 7894
4	2618362 $\pm$ 19950	2447472 $\pm$ 18611	2667524 $\pm$ 20330	893213 $\pm$ 6631	1995771 $\pm$ 15143
5	2045381 $\pm$ 7684	2164178 $\pm$ 8129	2324776 $\pm$ 8730	475315 $\pm$ 1803	1420592 $\pm$ 5366
6	420358 $\pm$ 4359	521503 $\pm$ 5424	274609 $\pm$ 2824	71926 $\pm$ 691	188704 $\pm$ 1920
7	271155 $\pm$ 3232	329700 $\pm$ 3876	168141 $\pm$ 2099	26129 $\pm$ 145	156666 $\pm$ 1973

<sup>1</sup>ац-ацетон; <sup>2</sup>хло-хлороформ; <sup>3</sup>ет-етил ацетат; <sup>4</sup>мет-метанол; <sup>5</sup>пет-петрол етар.<sup>12</sup>

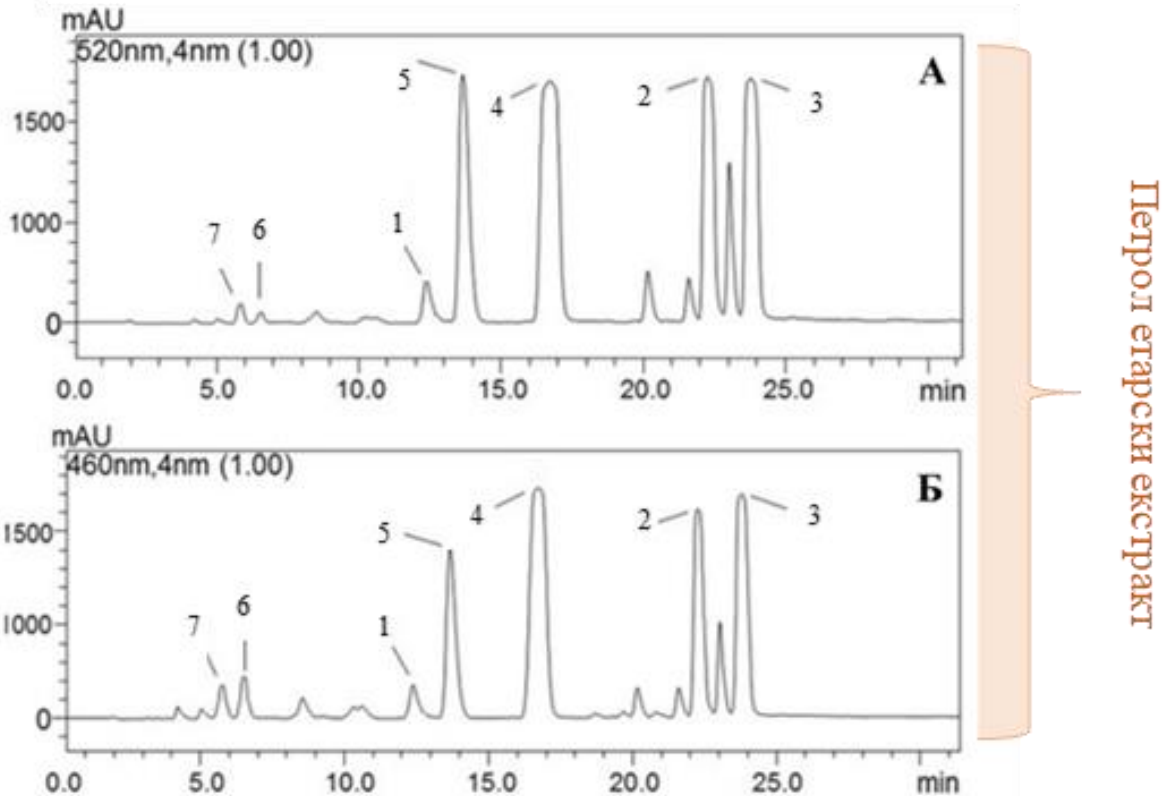


Слика 4.45. HPLC-PDA хроматограми екстракта ацетона и хлороформа, на  $\lambda=520$  нм (А) и  $\lambda=460$  нм (Б). Идентификација пикова: деоксишиконин (1), изобутирилишконин (2),  $\alpha$ -метилбутирилишконин (3), ацетилишконин (4),  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконин (5), 5,8-О-диметил изобутирилишконин (6) и 5,8-О-диметил деоксишиконин (7).



Слика 4.46. HPLC-PDA хроматограми екстракта (етил ацетат и метанол) на  $\lambda=520$  nm (А) и  $\lambda=460$  nm (Б). Идентификација пикова: деоксишиконин (1), изобутирилишконин (2),  $\alpha$ -метилбутирилишконин (3), ацетилишконин (4),  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконин (5), 5,8-О-диметил изобутирилишконин (6) и 5,8-О-диметил деоксишиконин (7).





Слика 4.47. HPLC-PDA хроматограми екстракта петрол етара на  $\lambda=520$  nm (А) и  $\lambda=460$  nm (Б). Идентификација пикова: деоксишиконин (1), изобутирилшиконин (2),  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4),  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5), 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин (6) и 5,8-*O*-диметил деоксишиконин (7).

У Табела 4.3. представљени су резултати квантитативне анализе ацетонског, хлороформског, етил ацетатног, метанолног и петрол етарског екстракта ризома биљке *O. visianii* Clem, и дати су као mg/g екстракта. У погледу укупне концентрације испитиваних нафтохинона, као најефикаснији растварачи за екстракцију показали су се хлороформ (138,879 mg/g), ацетон (138,314 mg/g) и етил ацетат (136,268 mg/g), док је петрол етар (89,632 mg/g) показао слабију ефикасност екстракције. Најмањи принос деривата нафтохинона примећен је у метанолном екстракту (39,564 mg/g).

Из представљених резултата може се закључити да је ацетилшиконин (4) идентификован као главна компонента свих екстраката са концентрацијама у опсегу од 16,027 mg/g до 49,231 mg/g. У високим концентрацијама идентификовани су и изобутирилшиконин (2) (8,403 mg/g-28,990 mg/g) и  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3) (6,150 mg/g-28,998 mg/g), док су у јако ниској концентрацији идентификована оба 5,8-*O*-диметил

деривата **6** (1,398 mg/g-11,035 mg/g) и **7** (0,988 mg/g-7,028 mg/g), али и деоксишиконин (**I**) (2,953 mg/g-6,123 mg/g) <sup>12</sup>.

**Табела 4.3.** Концентрације нафтохинона у различитим екстрактима корена биљке *O. visianii*. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD од три независна експеримента.

Једињење	<sup>1</sup> RT (min)	Концентрација (mg/g)				
		Екстракти				
		<sup>2</sup> ац	<sup>3</sup> хло	<sup>4</sup> ет	<sup>5</sup> мет	<sup>6</sup> пет
<b>1</b> деоксишиконин	12,612	4,686 $\pm$ 0,016	3,155 $\pm$ 0,016	6,123 $\pm$ 0,011	3,131 $\pm$ 0,019	2,953 $\pm$ 0,019
<b>2</b> изобутирилшиконин	22,314	27,150 $\pm$ 0,019	27,998 $\pm$ 0,024	28,990 $\pm$ 0,021	8,403 $\pm$ 0,033	16,917 $\pm$ 0,021
<b>3</b> $\alpha$ -метилбутирилшиконин	23,887	28,735 $\pm$ 0,011	28,998 $\pm$ 0,019	25,667 $\pm$ 0,026	6,150 $\pm$ 0,021	15,385 $\pm$ 0,018
<b>4</b> ацетилшиконин	16,745	48,311 $\pm$ 0,046	45,113 $\pm$ 0,062	49,231 $\pm$ 0,066	16,027 $\pm$ 0,027	36,660 $\pm$ 0,064
<b>5</b> $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин	13,895	14,702 $\pm$ 0,038	15,552 $\pm$ 0,042	16,701 $\pm$ 0,029	3,467 $\pm$ 0,017	10,231 $\pm$ 0,031
<b>6</b> 5,8- <i>O</i> -диметил изобутирилшиконин	6,057	8,867 $\pm$ 0,041	11,035 $\pm$ 0,044	5,743 $\pm$ 0,016	1,398 $\pm$ 0,011	3,901 $\pm$ 0,017
<b>7</b> 5,8- <i>O</i> -диметил деоксишиконин	5,823	5,863 $\pm$ 0,034	7,028 $\pm$ 0,031	3,813 $\pm$ 0,013	0,988 $\pm$ 0,004	3,585 $\pm$ 0,019

<sup>1</sup>RT-ретенционо време; <sup>2</sup>ац-ацетон; <sup>3</sup>хло-хлороформ; <sup>4</sup>ет-етилацетат; <sup>5</sup>мет-метанол; <sup>6</sup>пет-петролетар.<sup>12</sup>

Ху (Hu) и сарадници су испитивали садржај нафтохинона (ацетилшиконина, деоксишиконина, изобутирилшиконина,  $\alpha$ -метилбутирилшиконина,  $\beta$ -ацетоксиизовалерилшиконина и  $\beta$ ,  $\beta$ -диметилакрилшиконина) у метанолним екстрактима осам различитих биљних врста рода *Onosma* (*O. waltonii* Duthic, *O. hookeri* Clarke, *O. hookeri* Clarke var. *longiflorum* Duthie, *Onosma paniculatum* Bur. et Franch., *O. exsertum* Hemsl. и *O. confertum*)<sup>41</sup>. Метанолни екстракт *O. visianii* квантитификован у овој докторској дисертацији показао је значајно већи садржај испитиваних деривата нафтохинона од свих квантитификованих врста у студији коју су објавили Ху (Hu) и сарадници.

Узимајући у обзир представљене резултате може се закључити да хлороформ, ацетон и етил ацетат представљају боље раствараче за прелиминарну екстракцију биоактивних деривата нафтохинона **2**, **3** и **4**, док је за екстракцију 5,8-*O*-диметил деривата (**6** и **7**) пожељнија употреба само ацетона или хлороформа. Такође, ови резултати указују и на то да је корен биљке *O. visianii* богат извор деривата шиконина, и може се у те сврхе употребљавати уместо других биљака из породице Boraginaceae чије је нативно станиште Азија<sup>12,56</sup>.

#### 4.4. Цитотоксична активност екстраката корена биљке *O. visianii* Clem

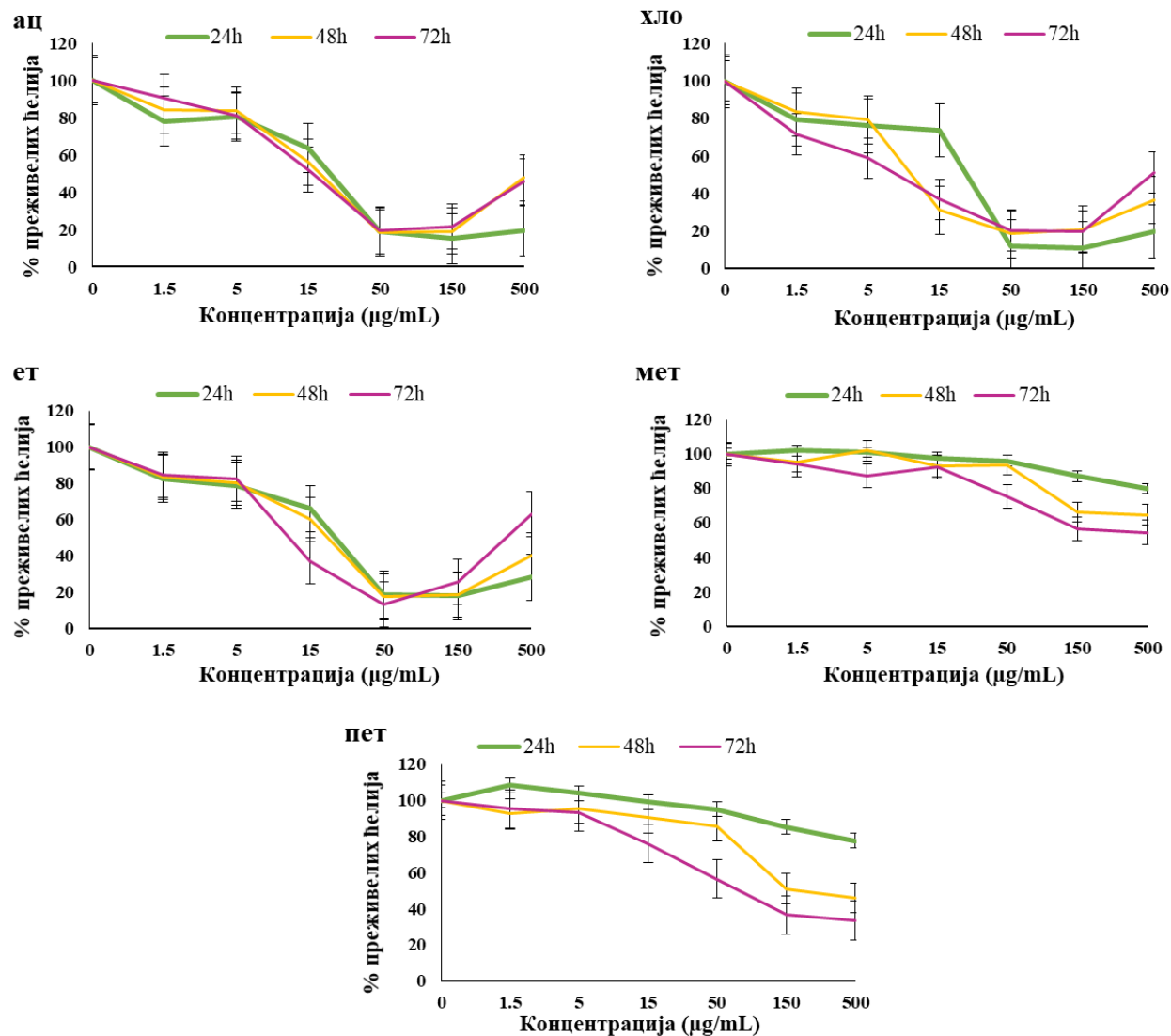
Како смо показали да су екстракти веома богати биоактивним нафтохинонским дериватима, следећи корак у изради ове дисертације био је испитати њихов цитотоксични ефекат. Цитотоксична активност свих пет екстраката (ацетонског, хлороформског, етил ацетатног, метанолног и петрол етарског) испитана је на две ћелијске линије, на хуманој ћелијској линији канцера дебелог црева (HCT-116) и хуманој ћелијској линији аденокарцинома дојке (MDA-MB-231). Под истим условима, као позитивна контрола, праћена је и способност познатог антиканцерогеног лека, цисплатине, да инхибира раст ове две ћелијске линије. Ефекат екстраката праћен је у временским интервалима од 24 h, 48 h и 72 h. Резултати су дати као IC<sub>50</sub> вредности, односно концентрације које убијају 50 % ћелија (µg/mL) и представљени су у Табела 4.4., док су на Слика 4.48. и Слика 4.49. приказане дозно-зависне криве ефеката различитих екстраката 24 h, 48 h и 72 h након третмана.

**Табела 4.4.** Цитотоксична активност различитих екстраката корена биљке *O. visianii* Clem и стандардне цисплатине на две ћелијске линије (HCT-116 и MDA-MB-231) изражена преко IC<sub>50</sub> вредности (µg/mL)

Ћелијске линије и екстракти	<sup>1</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	24 h	48 h	72 h
<b>HCT-116</b>			
Ацетон	34,69±0,75	32,62±0,49	36,83±0,54
Хлороформ	30,08±0,78	17,57±0,47	7,56±0,26
Етил ацетат	46,42±0,73	27,44±0,50	30,63±0,37
Метанол	>500	232,23±13,19	172,39±11,81
Петрол етар	404,57±32,78	157,68±9,8	102,07±7,84
Цисплатина	79,10 ± 7,9	<sup>2</sup> n.d.	31,32 ± 5,9
<b>MDA-MB-231</b>			
Ацетон	78,49±0,74	9,13±0,20	8,11±0,38
Хлороформ	32,82±0,56	34,38±0,63	13,16±0,35
Етил ацетат	109,06±0,55	16,6±0,14	22,13±0,41
Метанол	>500	>500	>500
Петрол етар	>500	>500	>500
Цисплатина	127,59 ± 15,6	n.d.	34,23 ± 6,7

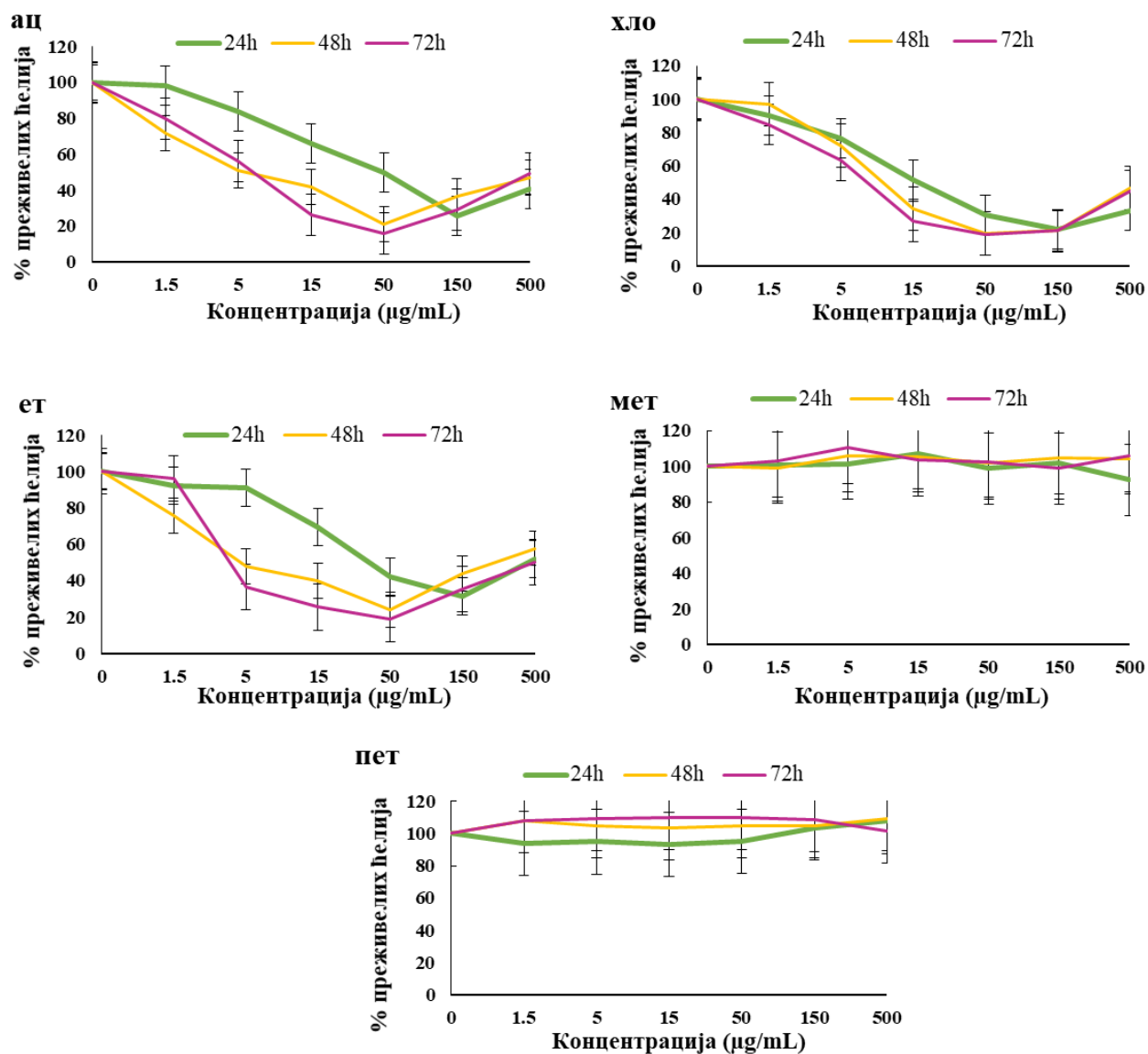
<sup>1</sup>IC<sub>50</sub> вредности (дате као средње вредности ± SD) су добијене из три независна мерења у трипликату, <sup>2</sup>n.d.-недефинисано <sup>12</sup>.

## НСТ-116



**Слика 4.48.** Дозно-зависне криве ефеката различитих екстраката (ац-ацетонски екстракт, хлор-хлороформски екстракт, ет-етил ацетатни екстракт, мет-метанолни екстракт, пет-петрол етарски екстракт) корена биљке *O. visianii* Слет на НСТ-116 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

## MDA-MB-231



**Слика 4.49.** Дозно-зависне криве ефеката различитих екстраката (ац-ацетонски екстракт, хлороформски екстракт, ет-етил ацетатни екстракт, мет-метанолни екстракт, пет-петрол етарски екстракт) корена биљке *O. visianii* Слет на MDA-MB-231 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

Представљени резултати показују генерално већу осетљивост MDA-MB-231 ћелијске линије од НСТ-116 на деловање тестираних екстраката. Хлороформски екстракт има дозно и временски зависан ефекат на вијабилност НСТ-116 ћелија са  $IC_{50}$  вредностима од 30,08  $\mu\text{g/mL}$ , 17,57  $\mu\text{g/mL}$  и 7,56  $\mu\text{g/mL}$  након третмана од 24 h, 48 h и 72 h. Такође,

примећује се и значајно смањење у проценту вијабилних ћелија ове ћелијске линије и при третману ацетонским и етил ацетатним екстрактом у дозној, али не и у временској зависности. У поређењу са хлороформским екстрактом, ова два екстракта показују слабију цитотоксичну активност. Ипак треба узети у обзир да хлороформски, ацетонски и етил ацетатни екстракти након третмана у временском периоду од 24 h испољавају ниже  $IC_{50}$  вредности од цисплатине. Након третмана од 72 h једино ацетонски екстракт показује ниже  $IC_{50}$  вредности од позитивне контроле, док хлороформски и етил ацетатни екстракт показују  $IC_{50}$  вредности јако сличне онима које испољава цисплатина. Из приложених резултата примећен је и јако слаб цитотоксични ефекат метанолног и петрол етарског екстракта на НСТ-116 ћелијској линији <sup>12</sup>.

На основу приказаних резултата за MDA-MB-231 ћелијску линију може се одмах закључити да, и у овом случају, метанолни и петрол етарски екстракти не испољавају значајан цитотоксичан ефекат. Ацетонски, хлороформски и етил ацетатни екстракт, са друге стране, значајно смањују број вијабилних ћелија MDA-MB-231 ћелијске линије, и имају јачи цитотоксични ефекат у поређењу са позитивном контролом, цисплатином. Међу њима, ацетонски екстракт је показао дозно и временски звисан ефекат на вијабилност MDA-MB-231 ћелија, а након третмана од 72 h показао је и најјачи цитотоксични ефекат ( $IC_{50}=8,11 \mu\text{g/mL}$ ) <sup>12</sup>.

Генерално, међу тестираним екстрактима, хлороформски екстракт испољава најјачи цитотоксични ефекат на обе ћелијске линије након краткотрајног третмана од 24 h (за НСТ-116 вредност  $IC_{50}=30,08 \mu\text{g/mL}$ , за MDA-MB-231 вредност  $IC_{50}=32,82 \mu\text{g/mL}$ ) <sup>12</sup>.

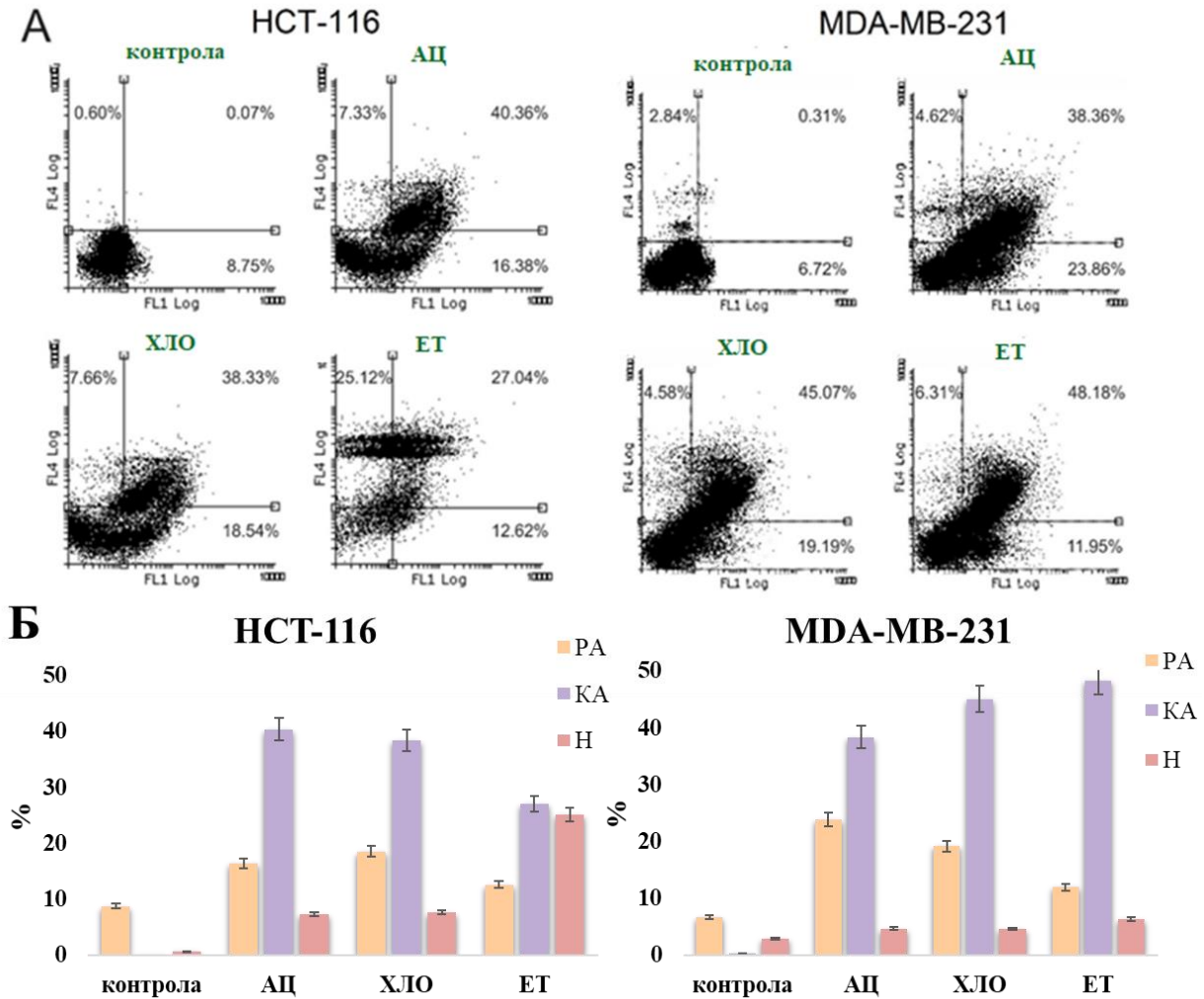
Значајно боља цитотоксична активност екстраката ацетона, хлороформа и етил ацетата према тестираним ћелијама канцера може се објаснити знатно већим садржајем биолошки активних нафтохинонских деривата, док се слабија активност екстраката метанола и петрол етра може приписати ниском садржају истих компоненти. Имајући у виду ове чињенице, може се закључити да је цитотоксични ефекат екстраката у директној корелацији са количином индивидуалних компоненти нафтохинонских пигмената, али се не сме занемарити ни синергистички ефекат присутних нафтохинона.

#### 4.5. Утицај изабраних екстраката на апоптозу НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија

На основу МТТ теста смо закључили да тестирани екстракти испољавају цитотоксичну активност, а употребом Annexin V-FITC/7-AAD кита испитивали смо могућност индукције апоптозе најактивнијих екстраката, и то ацетонског, хлороформског и етил ацетатног.

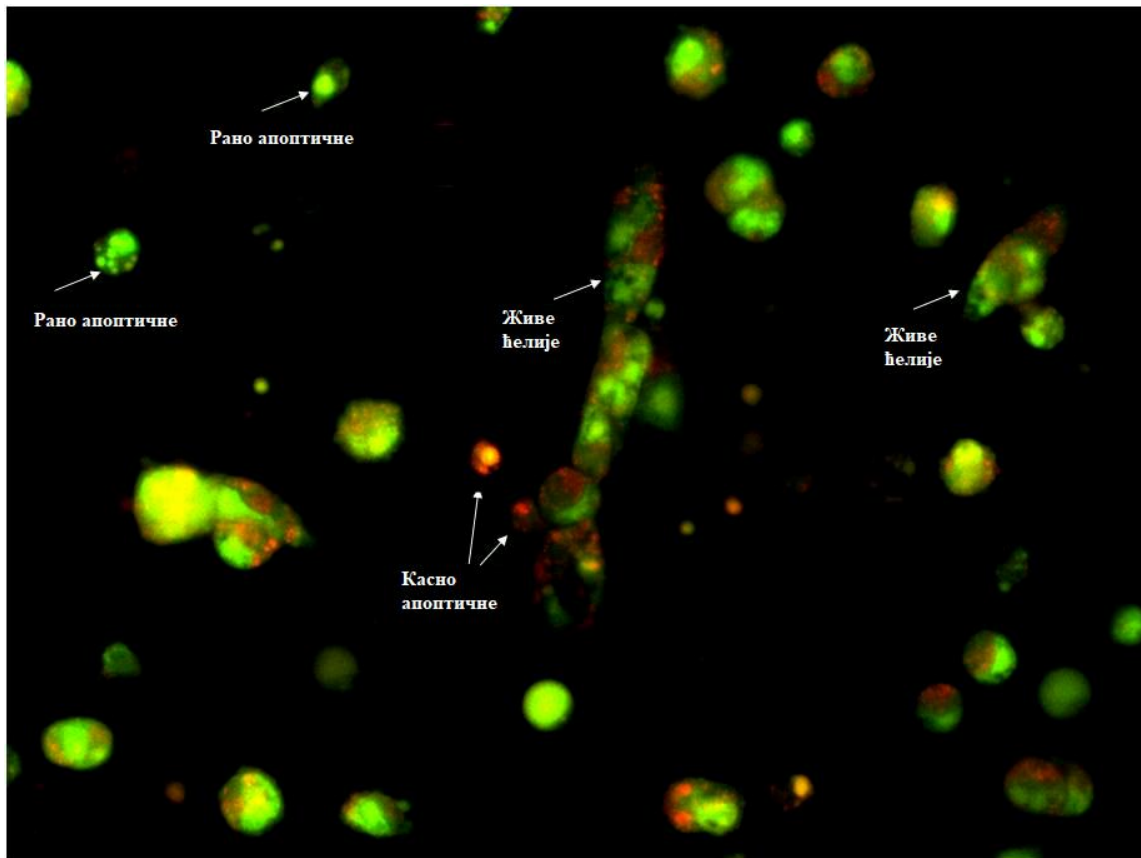
Индукција апоптозе посматрана је на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама које су третиране само медијумом (контрола) и поменути екстрактима у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима добијеним на основу МТТ теста. Резултати овог испитивања представљени су на *Слика 4.50.*, а из њих се може извести закључак да ацетонски, хлороформски и етил ацетатни екстракт на обе ћелијске линије индукују апоптозу са мањим процентом некротичних ћелија. Приметно је, такође, да тестирани екстракти увећавају број укупних апоптичних ћелија, при чему су касно апоптичне ћелије доминанте у обе ћелијске линије.

Како би потврдили апоптозу користили смо тест бојења ћелија АО/ЕБ смешом. Флуоресцентна микроскопија је показала да долази до промена у морфологији ћелија. Примећене појаве приказане на *Слика 4.51.* типичне су за апоптичне ћелије. Са представљене слике јасно се уочава да су НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије након третмана  $IC_{50}$  вредностима екстраката у времену од 48 h постале скупљене и округле, да је дошло до кондензације и фрагментације нуклеуса, као и формирања апоптотичних тела.



**Слика 4.50.** Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом употребом Annexin V-FITC/7-AAD бојења. (А) Представљена је дистрибуција ћелија по квадрантима и то вијабилних (доњи леви квадрант), некротичних (горњи леви квадрант), апоптичних (доњи десни квадрант) и касно апоптичних (горњи десни квадрант) НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних ацетонским (АЦ), хлороформским (ХЛО) и етил ацетатним (ЕТ) екстрактом. (Б) Дијаграми који представљају проценат рано апоптичних (РА), касно апоптичних (КА) и некротичних (Н) НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних ацетонским, хлороформским и етил ацетатним екстрактом. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

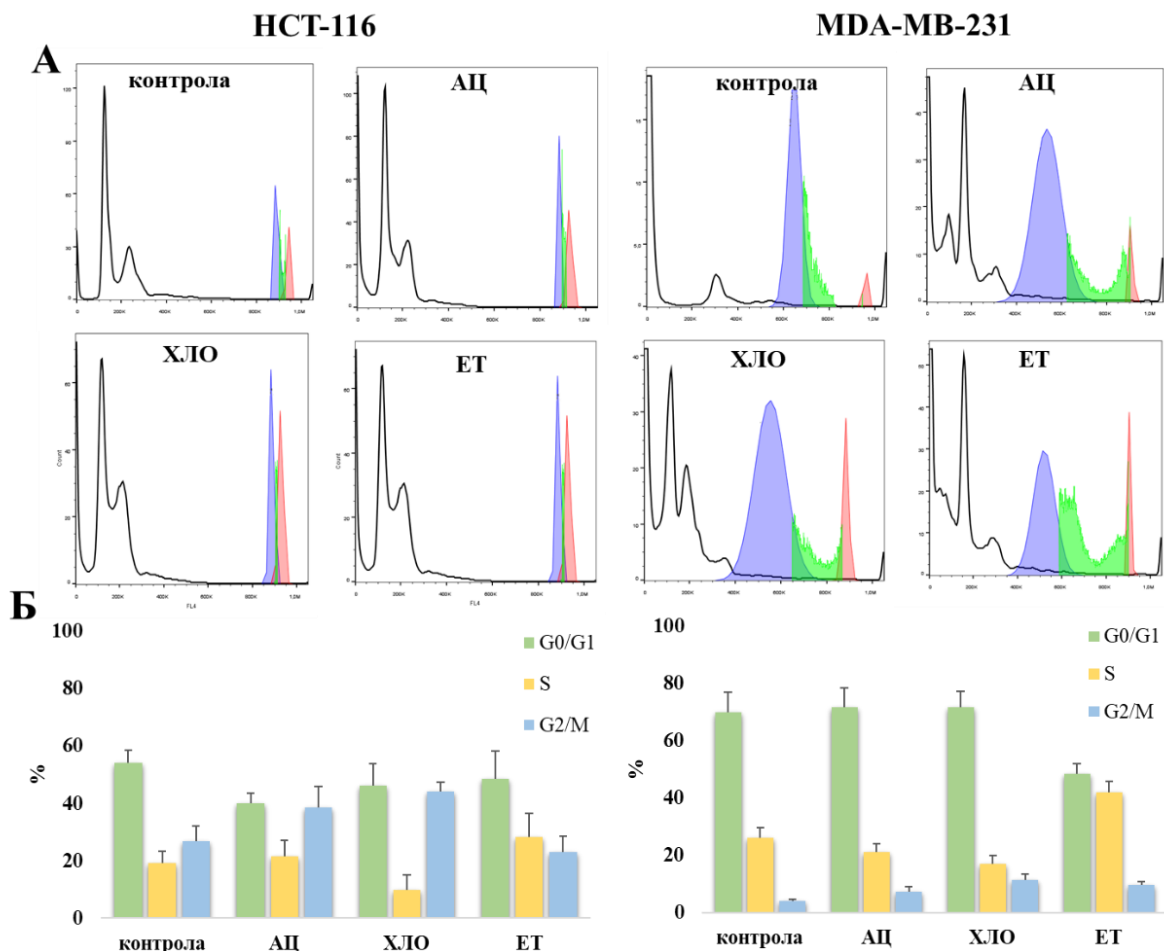




*Слика 4.51. Промене у ћелијској морфологији мерене АО/ЕВ флуоресцентним бојењем. Промене су посматране под флуоресцентним микроскопом (увеличање 400x). Живе ћелије имају зелена једра са дефинисаном структуром, рано апоптотске ћелије имају светло зелено до касно апоптотске имају наранџасто-црвено једро кондензованог или фрагментисаног хроматина.*

#### **4.6. Утицај изабраних екстраката на поделу ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија**

Како би смо даље разрешили механизам цитотоксичне активности ацетонског, хлороформског и етил ацетатног екстракта према НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама, користећи проточну цитометрију, испитали смо њихов ефекат на заустављање ћелијског циклуса. Хумана ћелијска линија канцера дебелог црева (НСТ-116) и хумана ћелијска линија аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) инкубирани су екстрактима у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима или само медијумом (контрола), у временском интервалу од 48 h, а резултати су представљени на *Слика 4.52.*



**Слика 4.52.** Анализа дистрибуције ћелијског циклуса проточном цитометријом. (А) Хистограми су репрезентативни за три независна експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија ацетонским (АЦ), хлороформским (ХЛО) и етил ацетатним (ЕТ) екстрактом. (Б) Дијаграми који представљају проценат застоја ћелијског циклуса у G0/G1, S или G2/M фазама код нетретираних ћелија (контрола) и третираних HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија ацетонским (АЦ), хлороформским (ХЛО) и етил ацетатним (ЕТ) екстрактом. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења.

Анализа ћелијског циклуса је показала да ацетонски и хлороформски екстракт инкудују умерено заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази, мада је овај ефекат израженији код HCT-116 ћелија (од 26,9 % у контролним ћелијама до 38,4 % и 44,1 % у ћелијама третираним ацетонским и хлороформским екстрактом). Етил ацетатни екстракт индукује знатно смањење ћелија у G0/G1 фази заједно са комплементарном акумулацијом ћелија спојених у S фази ( $p < 0,05$ ). У супротности са ацетонским и хлороформским екстрактима, ефекат који испољава етил ацетатни екстракт израженији је код MDA-MB-231 ћелија. Процент ћелија акумулираних у S фази повећан је са 19,2 % и 26,1 % колико се

налазило у контролним НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, до 28,3 % и 41,9 % у истим ћелијама третираним етил ацетатним екстрактом <sup>12</sup>.

Генерално, добијени резултати указују на то да ацетонски и хлороформски екстракти доводе до застоја у митози заустављајући ћелијски циклус у G2/M фази, док етил ацетатни екстракт прекида синтезу ДНК заустављајући ћелијски циклус у S фази <sup>12</sup>.

Како доводе до застоја ћелијског циклуса код НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија у различитим фазама, претподставка је да тестирани екстракти имају различите молекуларне мете. Ћелије канцера могу да мутирају чиме онеспособљавају специфичне застоје у ћелијском циклусу, и дозвољавају континуирану пролиферацију упркос оштећењу молекула ДНК, ипак, велики број хуманих ћелија канцера је јако хетероген у односу на „мутаторски фенотип“ <sup>162</sup>. Спекулише се да индивидуалне малигне ћелије укључују хиљаде насумичних мутација које су есенцијалне за гене који контролишу прогресију ћелијског циклуса и програмирану ћелијску смрт, и обично садрже мутације одговорне за губитак функција при чему се губи нормална функција тумор супресора. Најчешћа мутација, нађена у скоро 50 % хуманих канцера је инактивација p53 тумор супресора. Овај тумор супресор обично доводи до застоја у ћелијском циклусу у G1 фази, али постоје и докази да p53 контролише и улаз у митозу уколико ћелије пролазе кроз G2 фазу са оштећеним ДНК и/или када се ћелије задржавају у S фази услед блокаде приликом синтезе ДНК <sup>163</sup>. Када дође до мутација p53 тумор супресора, ћелије канцера постају резистентне на апоптозу индуковану p53, али имају неисправну G1 фазу с обзиром на то да није извршена активација p53-зависног p21 пута. Као последица ове мутације, ћелије се углавном ослањају на S и G2 фазу у циљу заустављања ћелијског циклуса, обнављању оштећења у молекулу ДНК и промовисању опстанка ћелије <sup>164</sup>. Из тог разлога, инхибиција S/G2 фазе представља потенцијалну стратегију са циљем да малигне ћелије учини осетљивијим на ДНК оштећења изазвана леком. Застој у G2 фази ћелијског циклуса индукованог ацетонским и хлороформским екстрактом, углавном у p53 НСТ-116 ћелијама, имплицира могући p53-зависни p21 пут као механизам за изазивање апоптозе, док специфични застој у S фази у p53 мутираним MDA-MB-231 ћелијама, индукован третманом етил ацетатним екстрактом, указује на p53 независну блокаду кључног регулатора Chk1 S фазе. Како је већ познато да деривати шиконина инхибирају топоизомеразу, важно је напоменути да програмирана

ћелијска смрт, селективна за S фазу, сугерише на инхибицију топоизомеразе-I, док застој ћелијског циклуса у G2 фази указује на могућност инхибиције топоизомеразе-II<sup>12,56,165,166</sup>.

#### 4.7. Цитотоксична активност изолованих нафтохинона 1-7

Цитотоксични ефекат изолованих нафтохинона, као и цисплатине у сврху позитивне контроле, испитиван је употребом МТТ теста на две ћелијске линије, хуманој ћелијској линији канцера дебелог црева (HCT-116) и хуманој ћелијској линији аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) при третманима од 24 h, 48 h и 72 h. Резултати су представљени као IC<sub>50</sub> вредности (µg/mL) и представљени у Табела 4.5..

**Табела 4.5.** Цитотоксична активност изолованих нафтохинона 1-7 на две ћелијске линије (HCT-116 и MDA-MB-231) изражена преко IC<sub>50</sub> вредности (µg/mL) 24 h, 48 h и 72 h након третмана

Ћелијске линије и тестирана једињења	IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
	HCT-116			MDA-MB-231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>1</b>	164,6 ± 13,9	124,4 ± 14,6	97,8 ± 8,7	>500	155,5 ± 14,5	118,9 ± 17,8
<b>2</b>	>500	395,2 ± 37,4	202,1 ± 18,4	>500	435,4 ± 29,5	424,7 ± 34,6
<b>3</b>	311,5 ± 22,1	22,5 ± 6,3	15,2 ± 4,5	>500	149,5 ± 17,7	86,0 ± 11,5
<b>4</b>	188,7 ± 19,2	49,2 ± 7,2	24,6 ± 6,6	>500	242,5 ± 26,8	80,2 ± 9,9
<b>5</b>	288,8 ± 23,9	36,2 ± 7,8	30,9 ± 6,9	>500	173,9 ± 14,6	204,6 ± 17,2
<b>6</b>	>500	>500	127,6 ± 9,4	>500	>500	411,5 ± 24,3
<b>7</b>	>500	>500	485,2 ± 28,2	>500	>500	391,6 ± 42,0
<b>цисплатина</b>	79,10 ± 7,9	<sup>2</sup> n.d.	31,32 ± 5,9	127,59 ± 15,6	n.d.	34,23 ± 6,7

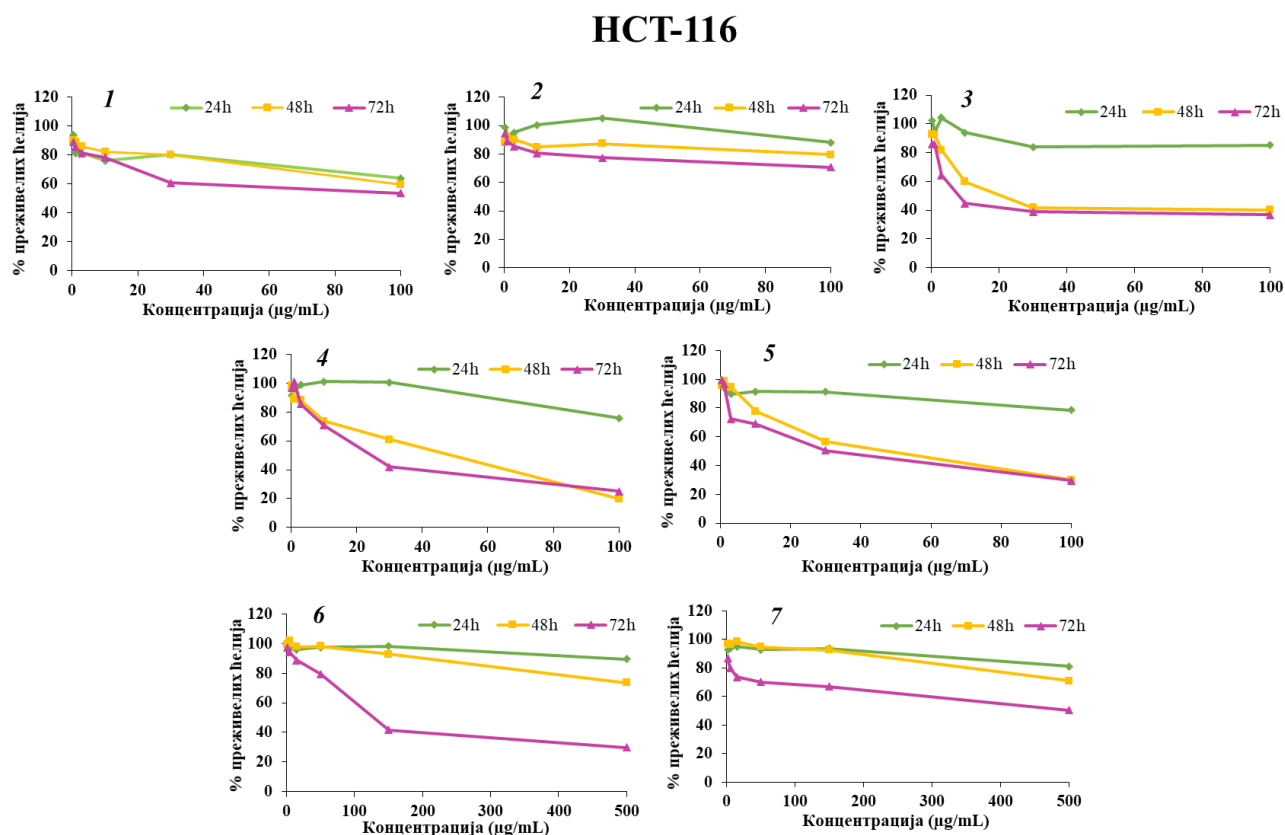
<sup>1</sup>IC<sub>50</sub> вредности (дате као средње вредности ± SD) су добијене из три независна мерења у трипликату, <sup>2</sup>n.d.- недефинисано.<sup>17</sup>

За разлику од екстраката, HCT-116 ћелијска линија показала је већу осетљивост на третман изолованим једињењима. Једињење **3** показало је најјачи цитотоксични ефекат на ћелијској линији канцера дебелог црева са IC<sub>50</sub> вредношћу од 15,2 µg/mL након 72 h од третмана. Примећено је и да након истог периода од третмана, једињења **1**, **4** и **5** значајно смањују вијабилност HCT-116 ћелијске линије са IC<sub>50</sub> вредностима од 97,8 µg/mL, 24,6 µg/mL и 30,9 µg/mL. У поређењу са референтним једињењем, цисплатином, једино једињења **3**, **4** и **5** показују снажнији цитотоксични ефекат према овој ћелијској линији<sup>17</sup>.

На основу резултата приказаних у Табела 4.5. може се приметити да једињења **3** и **4** испољавају најснажнији цитотоксични ефекат на хуманој ћелијској линији аденокарцинома

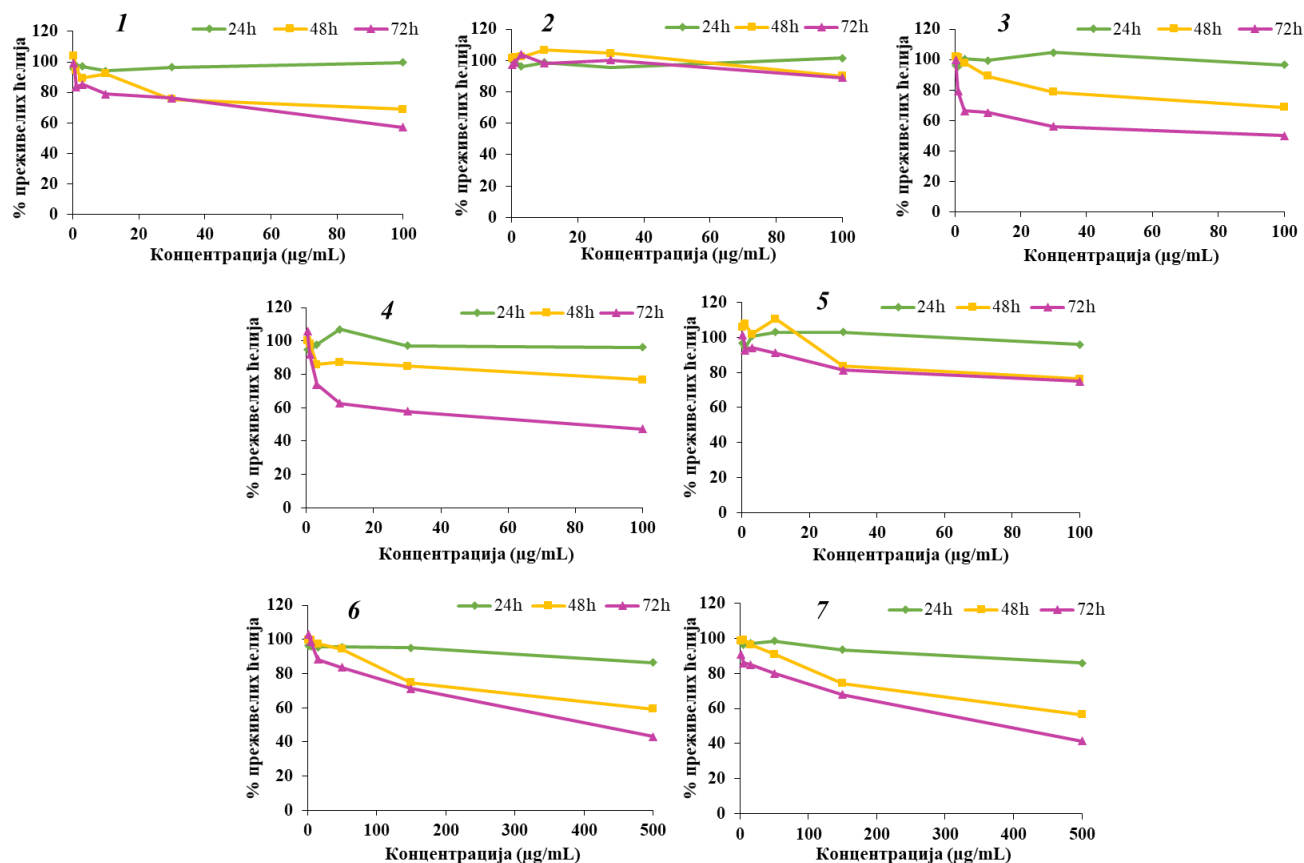
дојке након 72 h од третмана ( $IC_{50}$  вредности за **3** = 86,0  $\mu\text{g/mL}$ , и **4** = 80,2  $\mu\text{g/mL}$ ), док су остала тестирана једињења показала скромнији ефекат. У краткотрајном третману, од 24 h, тестирана једињења нису испољила цитотоксичну активност на MDA-MB-231 ћелијској линији. Из приложених резултата примећује се и значајно већи ефекат позитивне контроле, цисплатине, на поменутој ћелијској линији у свим тестираним временима у односу на изолована једињења <sup>17</sup>.

На *Слика 4.53.* и *Слика 4.54.* представљене су дозно-зависне криве ефеката изолованих једињења 24 h, 48 h и 72 h након третмана. На основу приказаних резултата долази се до генералног закључка да сва тестирана једињења временски и дозно зависно смањују вијабилност ћелија обе ћелијске линије.



*Слика 4.53.* Дозно-зависне криве ефеката изолованих једињења **1-7** на НСТ-116 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

## MDA-MB-231

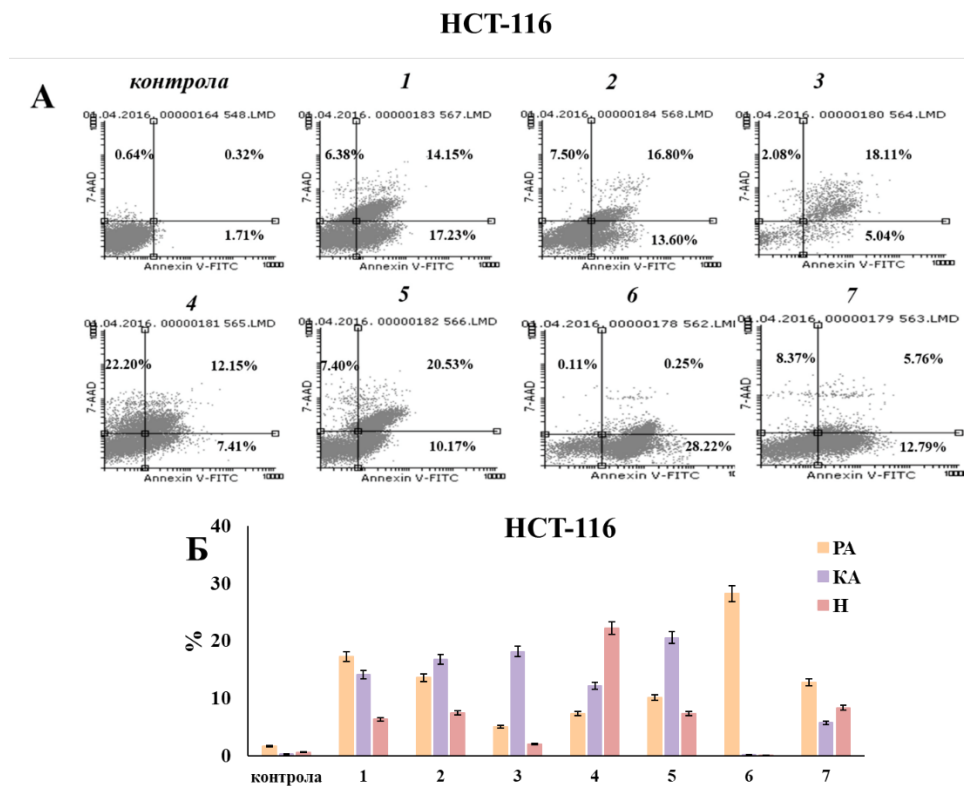


Слика 4.54. Дозно-зависне криве ефеката изолованих једињења 1-7 на MDA-MB-231 ћелијској линији 24 h, 48 h и 72 h након третмана. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

Представљени резултати су у сагласности са литературним подацима о цитотоксичности деривата шиконина на многим ћелијама канцера. Од 1500 тестираних хинона, 150 једињења показује јаку *in vivo* активност на W256 у пацовима и на P388 лимфоидној леукемији код мишева, као и значајну *in vivo* потенцију према KB ћелијама и ћелијама леукемије CCRF-CEM<sup>56</sup>. Кретсчмер (Kretschmer) и сарадници су показали (употребом ХТТ теста) да изоловани нафтохинони из корена биљке *O. paniculata* и то 4, 5, и смеша 3 и изовалерилшиконина показују јаку активност према неким ћелијама меланома (SBcl2, WM35, WM9 и WM164), канцера дебелог црева (HCT-116), канцера дојке (MDA-MB-231) и на ћелијама леукемије (CCRF-CEM)<sup>157</sup>.

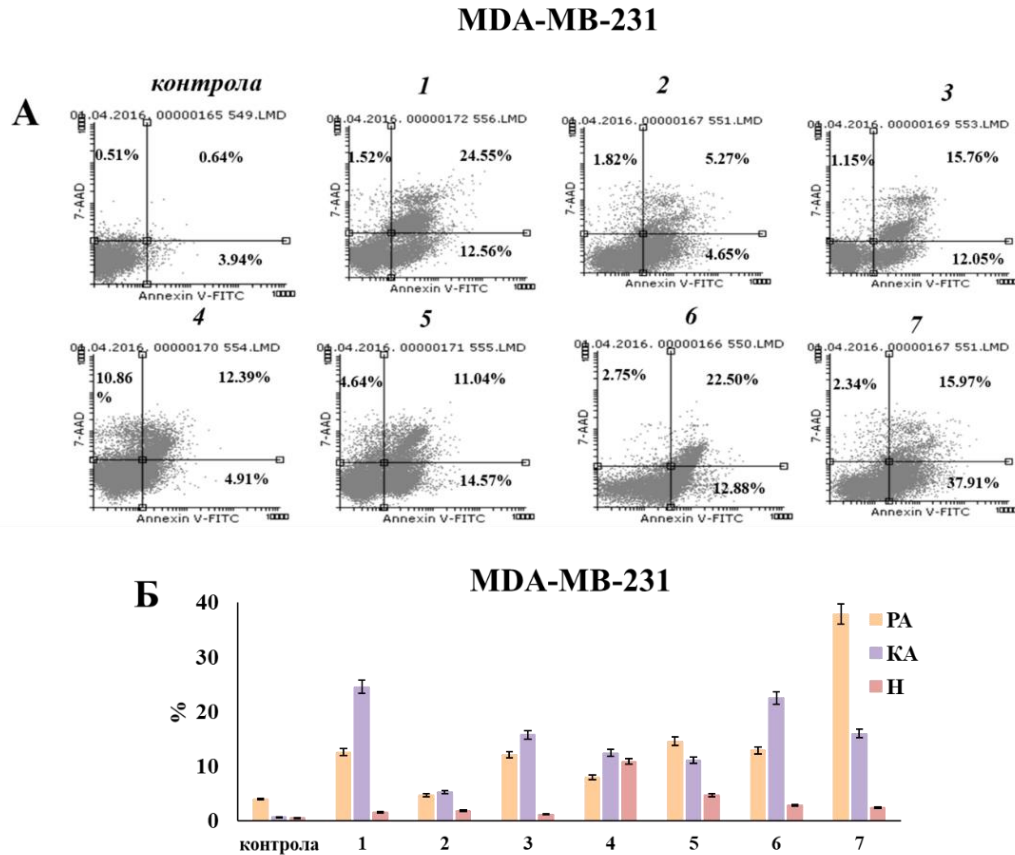
### 4.8. Ефекат изолованих нафтохинона на апоптозу НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија

Употребом Annexin V-FITC/7-AAD кита проточном цитометријом одређен је тип ћелијске смрти код НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија након третмана једињењима **1-7**. Хумане линије канцера дебелог црева (НСТ-116) и аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) третиране су само медијумом (контрола) и једињењима **1-5** у концентрацији од 100 µg/mL и једињењима **6** и **7** у концентрацији од 500 µg/mL у временском периоду од 48 h. Добијени резултати представљени су на *Слика 4.55.* и *Слика 4.56.*



**Слика 4.55.** *Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом употребом Annexin V-FITC/7-AAD бојења. (А) Представљена је дистрибуција ћелија по квадрантима и то вијабилних (доњи леви квадрант), некротичних (горњи леви квадрант), апоптичних (доњи десни квадрант) и касно апоптичних (горњи десни квадрант) НСТ-116 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима 1-7. (Б) Дијаграми који представљају проценат рано апоптичних (РА), касно апоптичних (КА) и некротичних (Н) НСТ-116 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима 1-7. Резултати су представљени као средње вредности ± SD добијене из три независна мерења.*

Третман НСТ-116 ћелија показао је да изоловани нафтохинони **1-7** индукују апоптозу као примарни тип ћелијске смрти уз мали проценат некротичних ћелија, осим у случају третмана једињењем **4**, које индукује већи проценат некротичних ћелија.



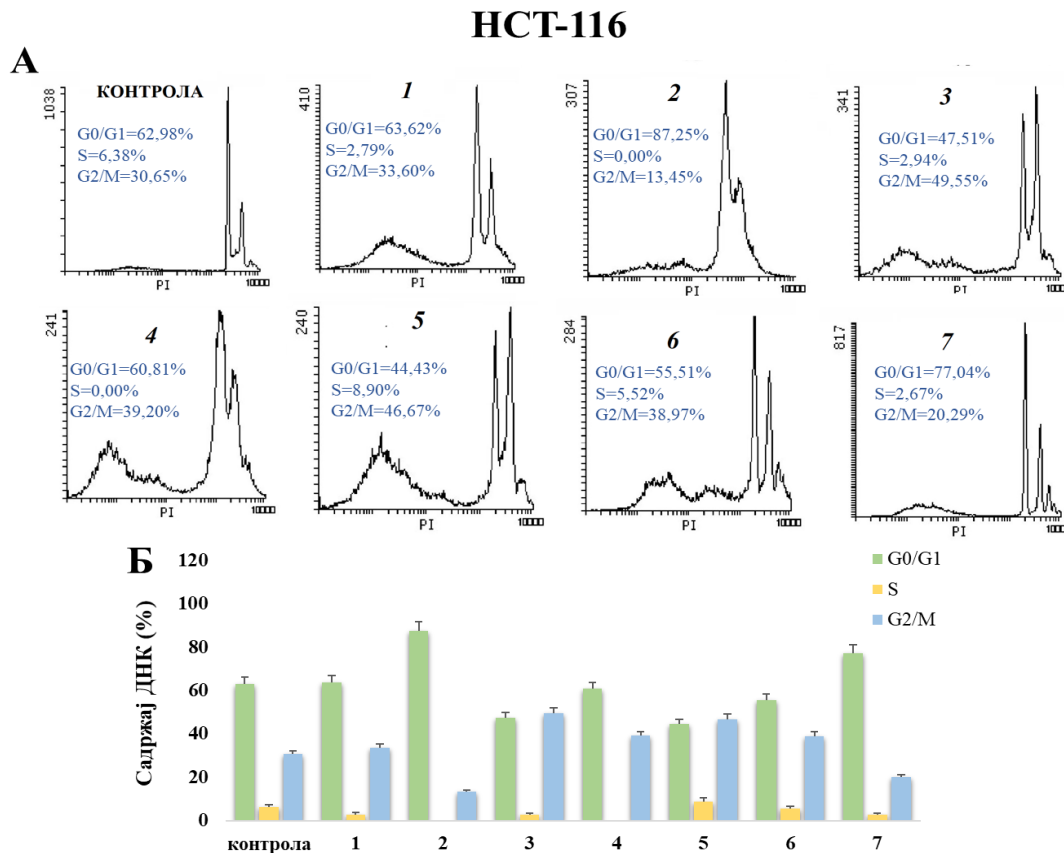
**Слика 4.56.** Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом употребом Annexin V-FITC/7-AAD бојења. (А) Представљена је дистрибуција ћелија по квадрантима и то вијабилних (доњи леви квадрант), некротичних (горњи леви квадрант), апоптичних (доњи десни квадрант) и касно апоптичних (горњи десни квадрант) MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима **1-7**. (Б) Дијаграми који представљају проценат рано апоптичних (РА), касно апоптичних (КА) и некротичних (Н) MDA-MB-231 ћелија нетретираних (контрола) и третираних изолованим нафтохинонима **1-7**. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

Код MDA-MB-231 ћелија примећен је исти тренд, односно, основни тип ћелијске смрти индукован третманом једињења **1-7** одговара апоптози. Приметно је такође и да је број некротичних ћелија знатно виши у третману једињењем **4**<sup>17</sup>.



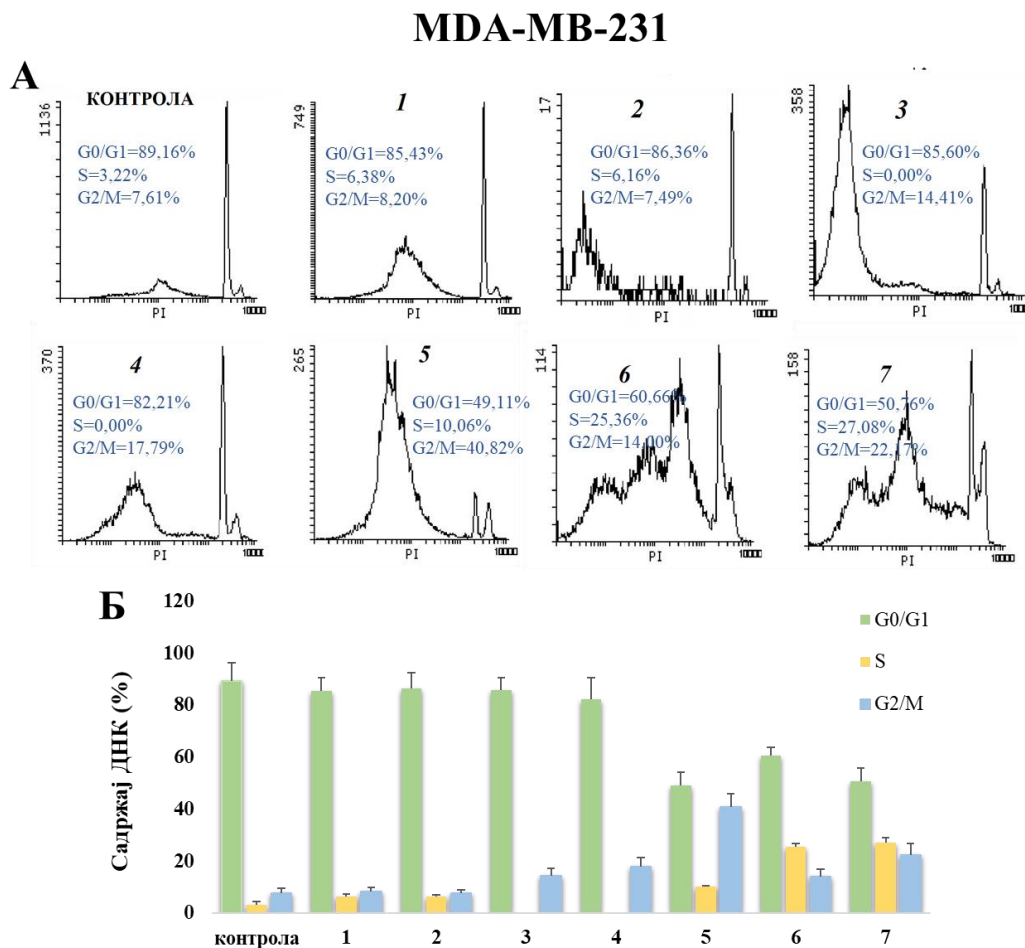
## 4.9. Ефекат изолованих нафтохинона на поделу ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија

У циљу добијања додатних информација о цитотоксичној активности једињења **1-7**, испитиван је њихов утицај на поделу ћелијског циклуса код хумане ћелијске линије канцера дебелог црева (НСТ-116) и хумане ћелијске линије аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) након третмана од 48 h. Тестиране ћелијске линије инкубиране су једињењима **1-5** у концентрацији од 100  $\mu\text{g/mL}$  и једињењима **6** и **7** у концентрацији од 500  $\mu\text{g/mL}$  или само медијумом (контрола). Добијени резултати су представљени на *Слика 4.57.* и *Слика 4.58.*



**Слика 4.57.** Анализа дистрибуције ћелијског циклуса проточном цитометријом. (А) Хистограми су репрезентативни за три независна експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних НСТ-116 ћелија изолованим једињењима **1-7**. (Б) Дијаграми који представљају проценат застоја ћелијског циклуса у G0/G1, S или G2/M фази код нетретираних ћелија (контрола) и третираних НСТ-116 ћелија изолованим једињењима **1-7**. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

Резултати добијеним третманом НСТ-116 ћелија показали су да је ефекат једињења **3, 4, 5** и **6** довео до повећања процента ћелија акумулираних у G2/M фази од 30,7 % колико је ћелија било у контроли, до 38,9 % - 49,6 %, колико их је било након третмана поменутиим једињењима, с тим да је најјачи ефект примећен након третмана једињењем **3** ( $p < 0,05$ ). Ипак, третман једињењима **2** и **7** показао је тренд повећања броја ћелија заустављених у G0/G1 фази : квантитативно повећан број ћелија износио је 24,3 % и 14,7 % више од контролних ћелија. Једињење **1** није показало никакве промене у профилу ћелијског циклуса код НСТ-116 ћелија <sup>17</sup>.



**Слика 4.58.** Анализа дистрибуције ћелијског циклуса проточном цитометријом. (А) Хистограми су репрезентативни за три независна експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних MDA-MB-231 ћелија изолованим једињењима 1-7. (Б) Дијаграми који представљају проценат застоја ћелијског циклуса у G0/G1, S или G2/M фази код нетретираних ћелија (контрола) и третираних MDA-MB-231 ћелија изолованим једињењима 1-7. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD добијене из три независна мерења

Код MDA-MB-231 ћелија третираних једињењима **3-7** приметно је значајно повећање процента ћелија акумулираних у G2/M фази ћелијског циклуса, са истовременим смањењем процента ћелија у G0/G1 фази ( $p < 0,05$ ). Процент MDA-MB-231 ћелија акумулираних у G2/M фази повећан је са 7,6 % колико је ћелија било у контроли, до 14,0 % - 40,8 % колико их је било након третмана једињењима **3-7**. Осим тога, третман једињењима **5, 6 и 7** у поређењу са контролом, довео је до значајног повећања ћелија заустављених у S фази ћелијског циклуса (од 3,2 % у контроли до 10,1 % након третмана једињењем **5**, 25,4 % након третмана једињењем **6** и 27,1 % након третмана једињењем **7**). Једињења **1 и 2** нису довела до промене профила ћелијског циклуса MDA-MB-231 ћелија <sup>17</sup>.

Циљ сваке терапије канцера је промовисање апоптозе, типа ћелијске смрти који је за разлику од некрозе, ограничена само на одумрле ћелије, при чему не утиче на околна ткива. С тим у вези, агенси који индукују апоптозу у ћелијама канцера имају примену у третману канцера. Физиолошки, ћелијски циклус и апоптоза су директно повезани. У оштећеним ћелијама заустављање ћелијског циклуса даје време ћелијама да активирају механизам репарације и поправе оштећења, а уколико настало оштећење не може бити поправљено активира се апоптоза. У супротном, уколико се не активира апоптоза, може доћи до неконтролисаног напредовања ћелијског циклуса што је главна карактеристика малигних ћелија <sup>167</sup>.

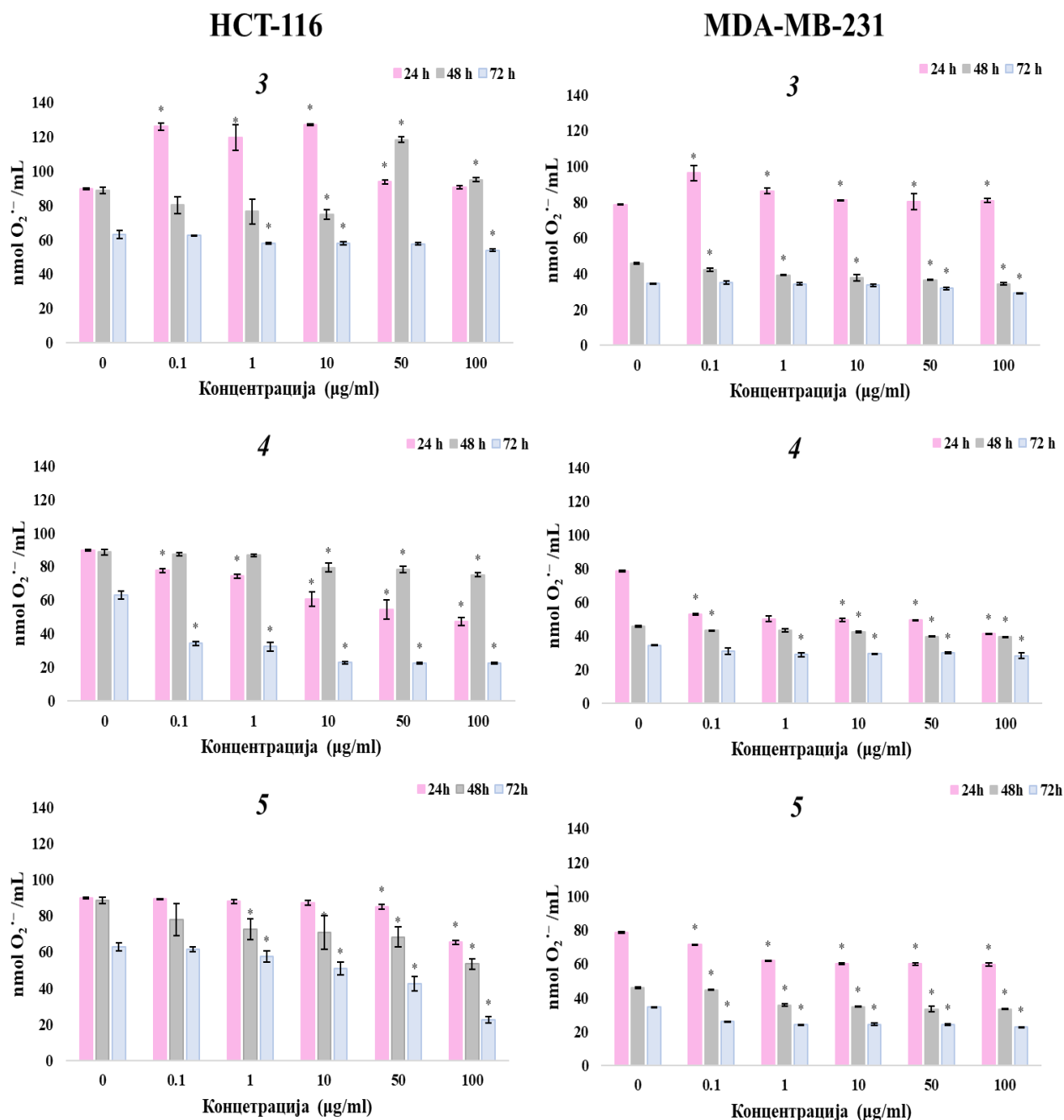
Наши резултати указују на то да нафтохинони заустављају митозу и ћелијски циклус у G0/G1, S или G2/M фазама, што за резултат даје апоптозу у циљаним ћелијама. Разлике у цитотоксичним ефектима изолованих нафтохинона на тестираним ћелијским линијама могу се објаснити различитим молекуларним метама ових једињења <sup>168</sup>. Код HCT-116 ћелија примећени застоји у G0/G1 фази ћелијског циклуса (код једињења **2 и 7**) или у S фази код MDA-MB-231 ћелија (код једињења **6 и 7**) указују на блокаду репликације ДНК и инхибиције топоизомераза I и II као могућег механизма активације апоптозе. Застој ћелијског циклуса у G2/M фази заједно са смањеном експресијом циклин-зависне киназе 1 и 2, као и доприносом ROS посредованих путева одговоран је за апоптозу у HCT-116 ћелијама индуковану третираним једињењима **3-6** и у MDA-MB-231 ћелијама идуковану третманом једињењима **3-7** <sup>165,169</sup>.

#### 4.10. Ефекат нафтохинона 3, 4 и 5 на маркере оксидативног стреса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија

Сумирањем резултата добијених на основу испитивања цитотоксичних ефеката изолованих нафтохинона 1-7,  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5) се издвајају као једињења која показују најјачи цитотоксични ефекат на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Стога смо испитали њихов ефекат на маркере оксидативног стреса као потенцијалних механизма проапоптотских и антипролиферативних својстава. Испитиване су концентрације супероксид анјон радикала, нитрита и глутатиона на хуманој ћелијској линији канцера дебелог црева (НСТ-116) и хуманој ћелијској линији аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) након третмана од 24 h, 48 h и 72 h нафтохинонима 3, 4 и 5.

##### 4.10.1. Ефекат нафтохинона 3, 4 и 5 на продукцију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ )

Реактивне врсте кисеоника (ROS) имају битну улогу у многим процесима у ћелији који су есенцијални за одржавање њихове хомеостазе, али могу бити и укључени у различите аспекте прогресије тумора попут метастаза и инвазије ћелија<sup>170</sup>. Супероксид анјон радикал је један од кључних елемената ROS-а, а у ћелијама се производи под нормалним физиолошким условима. У одређивању ефеката 3, 4 и 5 на продукцију супероксид анјона радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) код НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија користили смо NBT тест. Резултати добијени третманом НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија након 24 h, 48 h и 72 h изражени као pmol  $O_2^{\bullet-}$  /mL представљени су на *Слика 4.59. (Табела III).*



Слика 4.59.. Ефекти нафтохинона 3, 4 и 5 у концентрацијама од 0,1 to 100 µg/mL на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијске линије изражени као nmol O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/mL након 24 h, 48 h и 72 h од третмана. Резултати су представљени као средња вредност ± SE из три независна мерења

Представљени резултати указују на то да 3, 4 и 5 генерално повећавају продукцију O<sub>2</sub><sup>•-</sup> у тестираним ћелијама у поређењу са контролом (нетретираним ћелијама). Овај прооксидативни ефекат изабраних нафтохинона примећује се током свих третмана, а

најјачи је након 24 h од третмана. Као и при испитивању цитотоксичне активности, НСТ-116 ћелијска линија показала је већу осетљивост на ефекат изолованих тестираних нафтохинона у поређењу са MDA-MB-231 ћелијском линијом.

Од свих тестираних једињења  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (**3**), показује најјачи ефекат на продукцију супероксид анјон радикала у обе тестиране ћелијске линије и у свим третманима у поређењу са контролом. Ацетилшиконин (**4**) увећава продукцију  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 ћелијској линији само након 48 h од третмана, док се након 24 h и 72 h од третмана примећује инхибиција у продукцији супероксид анјон радикала. Ова појава може се објаснити прекомерном продукцијом азот-моноксида који реагује са  $O_2^{\cdot-}$ , дајући јако реактиван пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Међутим, у MDA-MB-231 ћелијској линији примећује се прооксидативни ефекат нафтохинона **4** након свих третмана.

Сумирањем представљених резултата долазимо до генералног закључка да тестирани нафтохинони **3** и **4** показују прооксидативну активност на обе тестиране ћелијске линије, што потврђује претподставку из претходног одељка да је допринос ROS посредованих путева један од разлога застоја ћелијског циклуса у G2/M фази у тестираним ћелијским линијама третираним једињењима **3** и **4**.

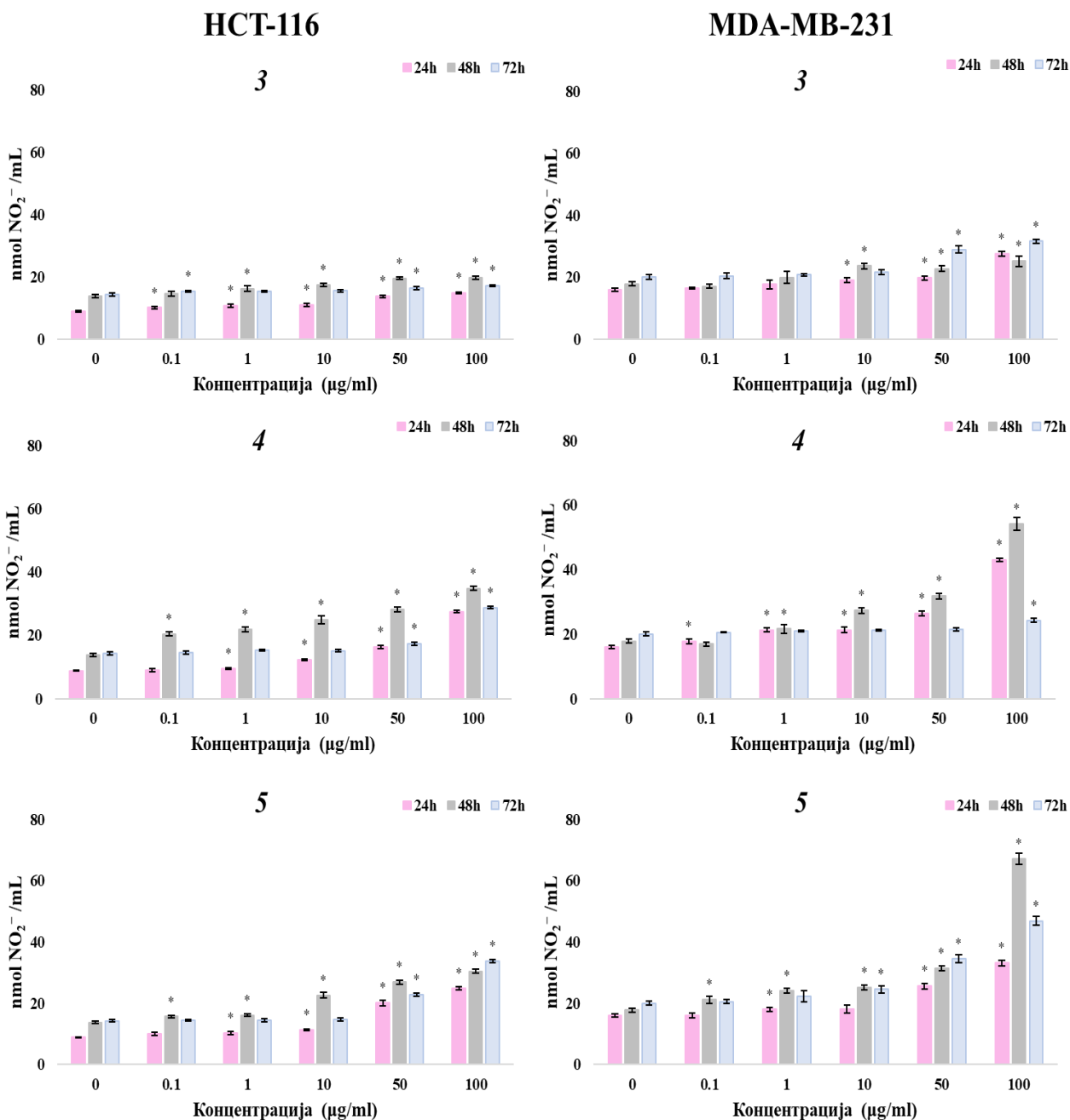
Литературни подаци показују да је за активност нафтохинона одговорно присуство хинонске структуре, при чему треба узети у обзир да за цитотоксични ефекат може бити одговоран и оксидативни стрес у ћелијама као и инхибиција топоизомераза I и II <sup>56</sup>. Механизам цитотоксичне активности хинона одражава се њиховом могућношћу да се подвргну реакцији редукције једног електрона која је катализована ензимима попут NADPH-цитохром P-450 редуктазе или митохондријалне NADH-убихинон оксидоредуктазе. Овом реакцијом формира се семихион радикал које се може даље аутооксидовати у присуству  $O_2$ , при чему се генерише хинон и супероксид анјон радикал <sup>31,56,57</sup>.

#### 4.10.2. Ефекат нафтохинона **3**, **4** и **5** на продукцију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )

Азот моноксид је значајан сигнални молекул у многим физиолошким и патолошким процесима, а има и улогу у прогресији многих типова канцера<sup>171</sup>. Ефекат једињења **3**, **4** и **5** на продукцију азот-монооксида (NO) код НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијских линија одређен је методом по Griess-у. Резултати добијени третманом НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија након 24 h, 48 h и 72 h изражени су као  $\text{nmol NO}_2^- / \text{mL}$  и представљени на *Слика 4.60*. (*Табела П2*).

Резултати представљени на *Слика 4.60*. указују на то да сви тестирани нафтохинони повећавају продукцију NO (азот-монооксида) мереног индиректно преко концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама након сва три третмана (24 h, 48 h и 72 h) у поређењу са нетретираним ћелијама. У овом случају уочено је да су МДА-МВ-231 ћелије биле осетљивије на ефекте третмана нафтохинонима **3**, **4** и **5**. Генерално сви тестирани нафтохинони у обе тестиране ћелијске линије имају највећи ефекат на продукцију азот-монооксида након 48 h од третмана.

Најјачи ефекат у продукцији нитрита примећује се код  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина (**5**). У случају третмана НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија  $\alpha$ -метилбутирилшиконом (**3**) продукција NO је била најнижа. Ова појава може се објаснити генерисањем пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ) услед хиперпродукције супероксид анјона. Jaw-Jou Kang и сарадници су показали да супероксид анјон смањује биолошку доступност NO што доводи до смањене производње NO или повећања оксидативне инактивације NO<sup>172</sup>. Резултати NBT теста су показали да нафтохинон **3** показује најјачи ефекат на продукцију супероксид анјон радикала па је ниска продукција NO, на основу представљених чињеница, била и очекивана.



**Слика 4.60.** Ефекти нафтохинона 3, 4 и 5 у концентрацијама од 0,1 до 100 µg/mL на НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијске линије изражени као nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mL након 24 h, 48 h и 72 h од третмана. Резултати су представљени као средња вредност ± SE из три независна мерења.



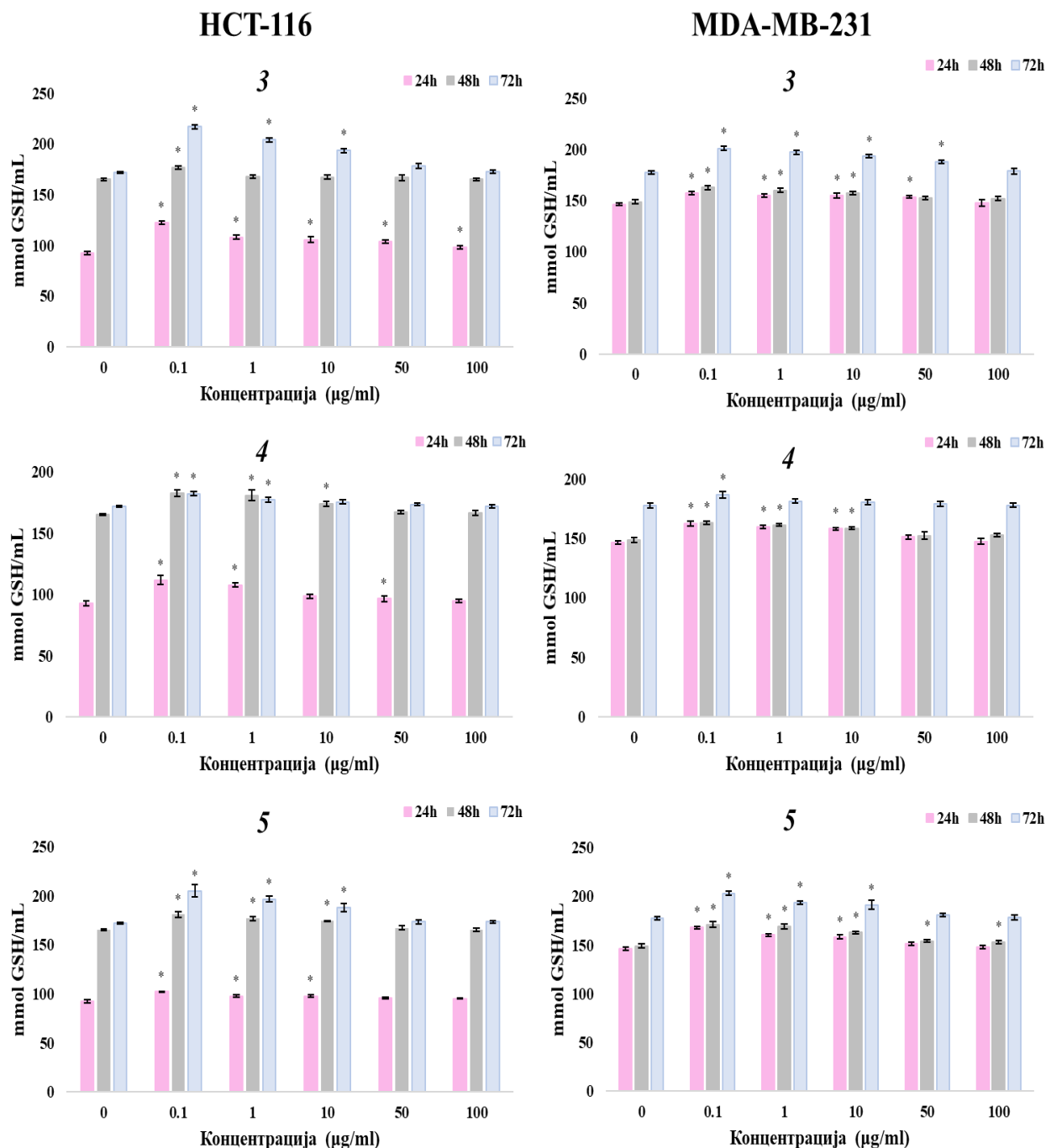
#### 4.10.3. Ефекат нафтохинона 3, 4 и 5 на концентрацију редукованог (GSH) и оксидованог (GSSG) глутатиона

Глутатион (GSH) и његова оксидована форма (GSSG) представљају битне маркере редокс статуса ћелије <sup>173</sup>. Редуковани глутатион је трипептид који се састоји од цистеина, глутамата и глицина, а представља једну од најјачих антиоксидативних компоненти у ћелијама. Овај трипептид има улогу у одржавању интрацелуларног статуса тиола, детоксикацији различитих метаболита, а и есенцијалан је за оптималну активност неких ензима и других ћелијских макромолекула <sup>174</sup>. Глутатион је такође и одличан електрон донор, па му ова способност омогућава улогу главне неензимске антиоксидативне компоненте као и могућност „хватања“ слободних радикала при чему се преводи у своју димерну оксидовану форму (GSSG) <sup>175</sup>.

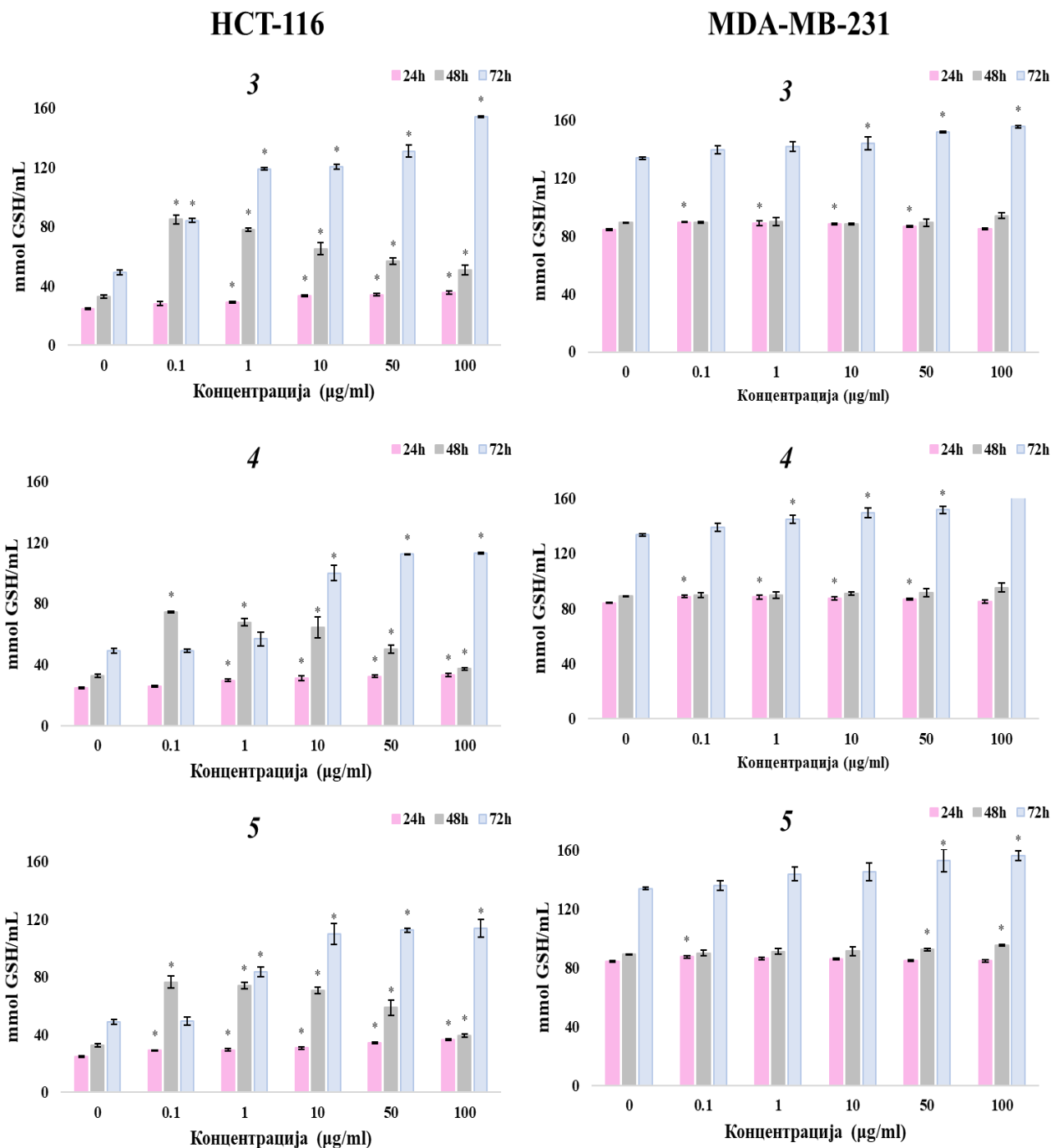
Промене у концентрацији редукованог и оксидованог глутатиона 24 h, 48 h и 72 h након третмана НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија нафтохинонима 3, 4 и 5 представљене су на Слика 4.61. (Табела П3) и Слика 4.62. (Табела П4).

Представљени резултати јасно указују да сви тестирани нафтохинони у свим третманима увећавају концентрацију како редукованог глутатиона, тако и његове оксидоване форме, у поређењу са контролом (нетретираним ћелијама).

Увећани нивои оксидованог глутатиона у третираним ћелија сугеришу на јаку антиоксидативну активност изазвану јаким оксидативним распадом тестираних једињења. Најјачи пораст обе форме глутатиона је у корелацији са високом концентрацијом супероксид анјон радикала. Повећани нивои редукованог глутатиона сугеришу на *de novo* синтезу GSH која се индукује при третману једињењима 3, 4 и 5 <sup>176</sup>. GSH се у ћелијама синтетише *de novo* и долази до брзе идукције интрацелуларне GSH синтезе као одговора на различите стресоре <sup>177</sup>.



**Слика 4.61.** Ефекти различитих концентрација нафтохинона 3, 4 и 5 на концентрацију редукваног глутатиона код HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија након третмана од 24 h, 48 h и 72 h. Резултати су представљени као средња вредност ± SE из три независна мерења.



**Слика 4.62.** Ефекти различитих концентрација нафтохинона 3, 4 и 5 на концентрацију оксидованог глутатиона код HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија након третмана од 24 h, 48 h и 72 h. Резултати су представљени као средња вредност ± SE из три независна мерења.

#### 4.11. Интеракције нафтохинона 3, 4 и 5 са биолошки важним молекулима

Инхибиција репликације ДНК молекула је главна мета активности лекова који показују антитуморско дејство, а поред тога литературно је потврђено да хиперпродукција реактивних кисеоничних врста (ROS) процесима оксидације изазива оштења и прекиде ланаца у молекулима ДНК. Осим тога и продукција азот-монооксида индукује модификације на ДНК ланцу, директно формирањем реактивних врста азота (RNOS) или индиректно инхибицијом процеса поправке молекула ДНК <sup>178,179</sup>.

ДНК и хумани серум албумин (HSA) представљају битне биомакромолекуле у организму човека. Молекул ДНК има улогу у преносу генетичких информација и једна је од главних мета многих терапеутских агенаса који укључују и секундарне метаболите биљака <sup>180,181</sup>. Мали молекули имају могућност везивања за пуринске или пиримидинске базе дуплог хеликса ДНК, и тиме мењају или инхибирају његове функције <sup>144</sup>. Испитивање интеракција између молекула ДНК и лекова постало је екстензивно изучавана област, не само у циљу разумевања механизма интеракција, већ и у циљу дизајнирања нових лекова <sup>144,182</sup>. Хумани серум албумин је кључни протеин у крвној плазми, има улогу у биорасположивости, дистрибуцији и елиминацији великог броја биолошки активних агенаса (лекова, токсина, природних производа, итд.) <sup>183</sup>. С обзиром на улоге хуманог серум албумина и дезоксирибонуклеинске киселине у човековом организму, проучавање њихових интеракција са биолошки активним једињењима може пружити битне информације о њиховим фармаколошким особинама.

##### 4.11.1. Интеракције нафтохинона 3, 4 и 5 са молекулом ДНК

До сада смо већ показали да изабрани нафтохинони  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3), ацетилшиконин (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин (5) показују цитотоксичну активност на туморским ћелијама као и да имају прооксидативни ефекат у канцерогеним ћелијама, као и способност да у истим продукују и  $\text{NO}_2^-$ . Самим тим, следећи корак био је утврдити да ли представљени резултати могу бити и последица интеракције ових једињења са молекулом СТ-ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина изолована из тимуса телета).

Молекул ДНК са лигандима може да реагује нековалентно на три начина: интеркалацијом, електростатичким везивањем преко фосфатне групе, или везивањем лиганда у жлеб између ланаца<sup>144,184</sup>. Интеракције су изучаване применом флуоресцентне и UV-Vis спектроскопије, као и молекулским докингом.

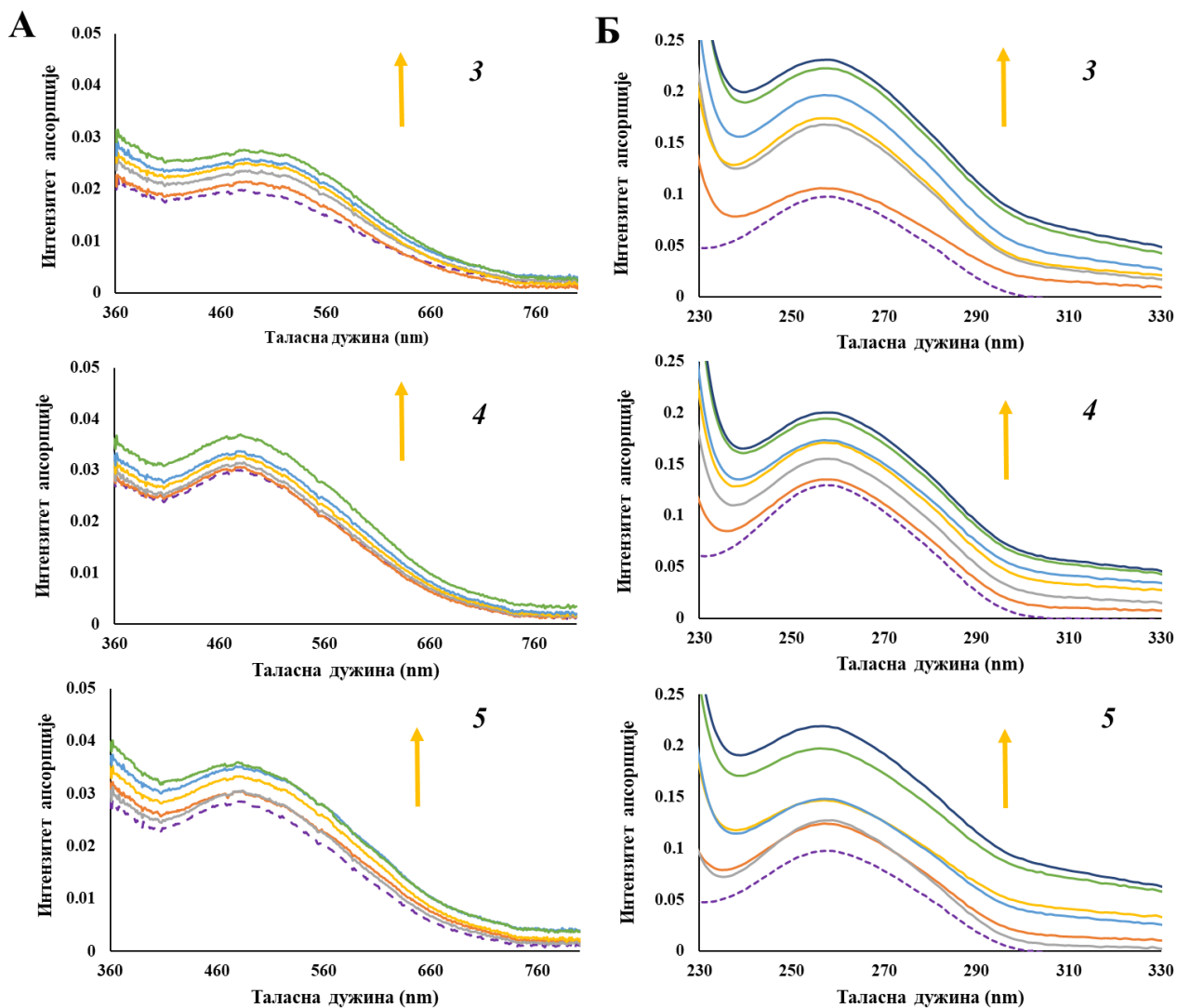
#### 4.11.1.1. UV-Vis спектроскопска мерења

Електронска апсорпциона спектроскопија је најједноставнија метода за изучавање интеракција између малих молекула и молекула ДНК. Посматрањем промена у UV-Vis спектрима реакције титрације раствора молекула ДНК растворима малих молекула можемо доћи до закључка о начину везивања испитиваних молекула за молекул ДНК. Познато је да молекул ДНК показује апсорпциони максимум на таласној дужини од 260 nm услед апсорпције пуринских и пиримидинских база<sup>144</sup>. Како молекул ДНК не показује апсорпције на таласним дужинама већим од 260 nm, пратили смо промене у интензитету апсорпционих максимума нафтохинона **3**, **4** и **5** чији се максимум апсорпције налази у опсегу од 460 nm - 600 nm. Ефекти увећаваних концентрација раствора СТ-ДНК на спектре нафтохинона **3**, **4** и **5** представљени су на *Слика 4.63.А*.

Са повећањем концентрације раствора СТ-ДНК примећује се мањи хиперхромни ефекат без очигледног црвеног или плавог померања. На основу ових резултата може се закључити да долази до интеракције између тестираних нафтохинона и СТ-ДНК. Интеркалација као мод везивања огледа се у хипохромном ефекту који је праћен и црвеним померањем. Приказани резултати на *Слика 4.63.А* указују на то да је интеркалација као начин везивања испитиваних нафтохинона **3**, **4** и **5** за молекул СТ-ДНК немогућа<sup>184</sup>. Примећене промене у спектрима нафтохинона **3**, **4** и **5** са већом вероватноћом указују на везивање тестираних нафтохинона нековалентним интеракцијама попут електростатичког везивања преко фосфатне групе, или везивањем лиганда у жлеб између ланаца<sup>182,184</sup>.

Како би потврдили добијене резултате, праћене су и промене у спектру раствора молекула СТ-ДНК у реакцији титрације увећаним концентрацијама испитиваних нафтохинона **3**, **4** и **5**. Добијени резултати приказани су на *Слика 4.63.Б*, и на основу њих се може приметити хиперхромни ефекат на апсорпциони максимум СТ-ДНК који се налази на 260 nm са повећањем концентрације тестираних нафтохинона. Такође, примећено је одсуство плавог или црвеног померања, што указује на то да се структура молекула СТ-

ДНК није значајно променила приликом везивања тестираних нафтохинона. Овај ефекат се може објаснити као последица везивања нафтохинона **3**, **4** и **5** у жлеб између ланаца молекула ДНК.

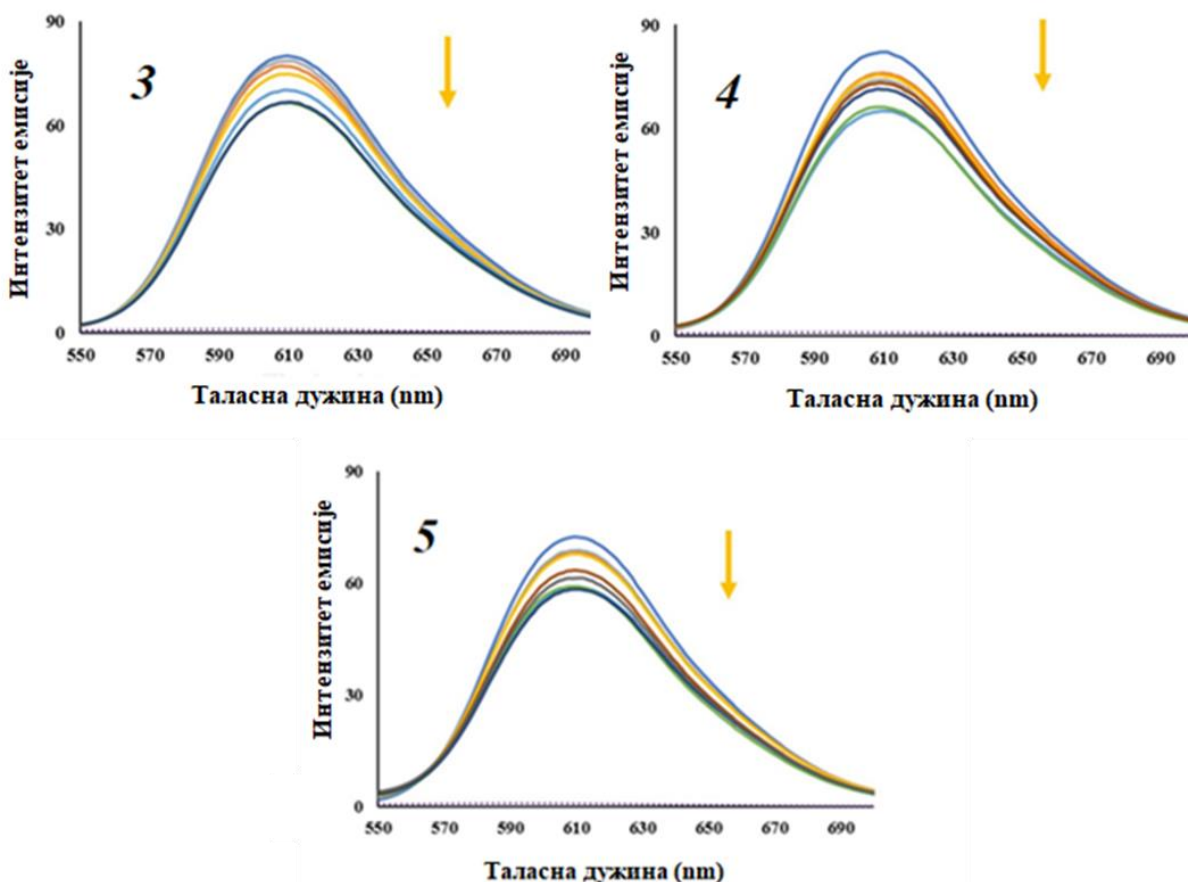


**Слика 4.63.** (А) Апсорпциони спектар  $\alpha$ -метилбутирилишконина (**3**), ацетилишконина (**4**) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (**5**) (концентрација сваког  $8,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) пре (љубичаста испрекидана линија) и након додатка раствора СТ-ДНК увећаних концентрација ( $0 - 1,73 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација СТ-ДНК. (Б) Апсорпциони спектар СТ-ДНК ( $1,77 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) пре (љубичаста испрекидана линија) и након додатка  $\alpha$ -метилбутирилишконина (**3**), ацетилишконина (**4**) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (**5**) ( $0 - 1,80 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација  $\alpha$ -метилбутирилишконина (**3**), ацетилишконина (**4**) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (**5**).

#### 4.11.1.2. Флуоресцентна спектроскопска мерења

Молекули попут етидијум бромида (ЕВ) који је класични индикатор интеркалативног везивања, или Hoechst 33342 који је индикатор везивања у жлебу између ланаца користе се за доказивање начина интеракција између молекула ДНК и нових лиганда<sup>182</sup>. Етидијум бромид (ЕВ) формира растворни комплекс приликом интеркалације између нуклеинских киселина у молекулу ДНК, при чему значајно повећава емисију његове флуоресценције<sup>144,182,185,186</sup>. Ова флуоресценција може се угасити додатком другог молекула, што се може објаснити заменом молекула ЕВ или електрон трансфером<sup>144,185,186</sup>. За разлику од етидијум бромида, Hoechst 33342 препознаје А-Т (аденин-тимин) богате регионе малог жлеба у ланцу ДНК<sup>182,187</sup>. Праћењем промене интензитета емисије флуоресценције комплекса Hoechst-ДНК или ЕВ-ДНК може се закључити са великом сигурношћу о начину везивања нових малих молекула за молекулу ДНК.

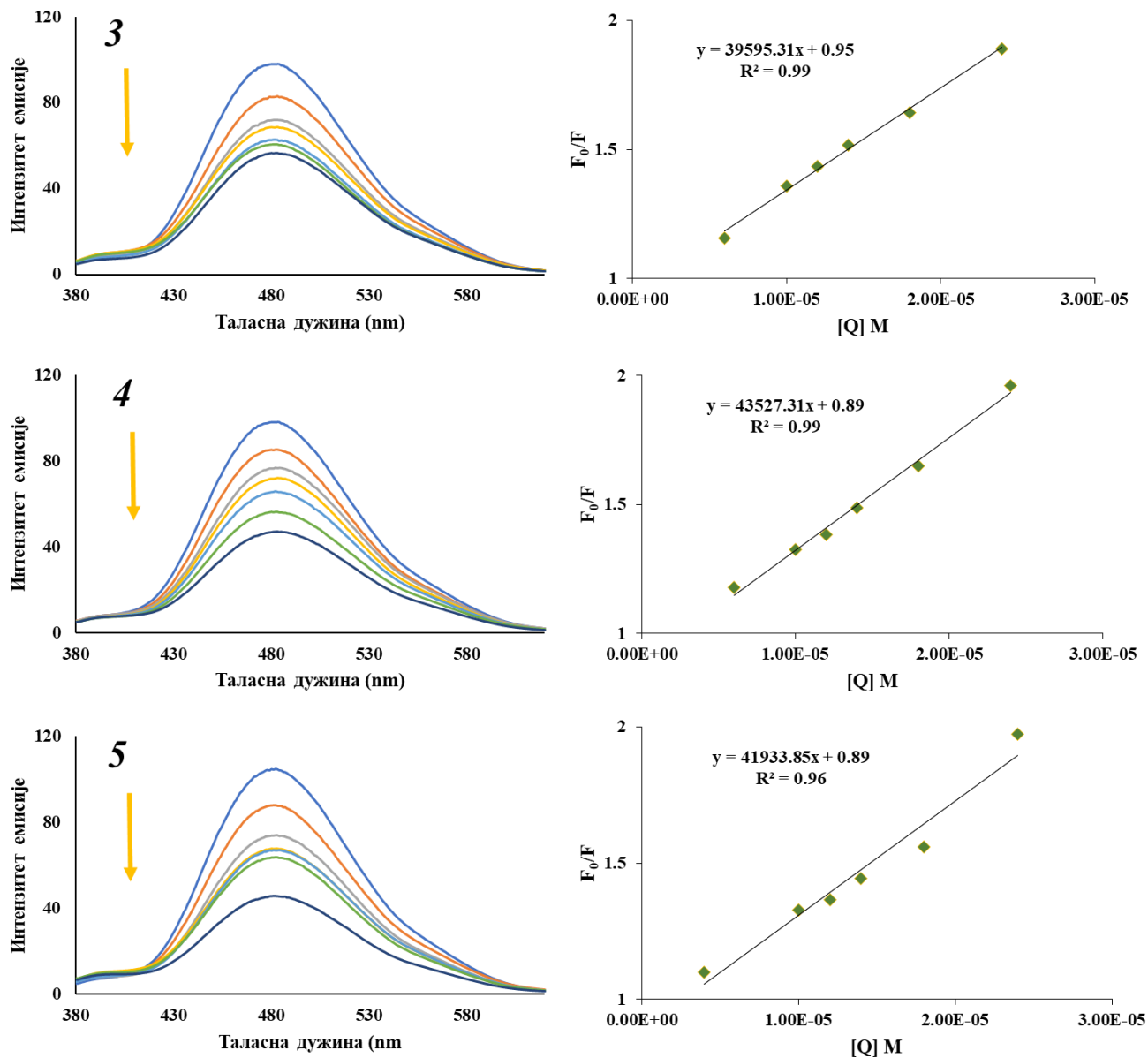
Емисиони спектри комплекса ЕВ-ДНК снимљени у одсуству и присуству увећаних концентрација нафтохинона **3**, **4** и **5** представљени су на *Слика 4.64.* На основу добијених резултата може се закључити да нема значајног смањења у интензитету флуоресценције комплекса ЕВ-ДНК са повећањем концентрација тестираних нафтохинона, што потврђује резултате добијене на основу UV-Vis спектроскопских мерења, да се тестирана једињења не везују интеркалативно за молекулу ДНК. Мало смањење интензитета флуоресценције може бити резултат формирања новог не-флуоресцентног ЕВ-ДНК-нафтохинон комплекса<sup>184,188</sup>.



**Слика 4.64.** Емисиони спектар ЕВ-ДНК комплекса (ЕВ ( $1,2 \times 10^{-5}$  М) и ДНК ( $1,72 \times 10^{-5}$  М)), у одсуству (љубичаста испрекидана линија) и присуству увећаних концентрација  $\alpha$ -метилбутирилишконина (**3**), ацетилишконина (**4**) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (**5**) (0 до  $2,4 \times 10^{-5}$  М). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација  $\alpha$ -метилбутирилишконина (**3**), ацетилишконина (**4**) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (**5**).

На Слика 4.65. представљени су емисиони спектри Hoechst-ДНК комплекса снимљени у одсуству и присуству увећаних концентрација нафтохинона **3**, **4** и **5**. Са спектра се јасно може увидети смањење интензитета емисије Hoechst-ДНК комплекса на таласној дужини од 350 nm приликом додавања увећаних концентрација нафтохинона **3**, **4** и **5**. Представљени резултати указују на то да тестирани нафтохинони истискују Hoechst 33342 из комплекса са молекулом ДНК, што потврђује нашу претпоставку да се тестирани нафтохинони везују за жлеб између ланаца молекула ДНК. Израчунате вредности Стерн-Волмерове константе гашења ( $K_{SV}$ ) износе  $3,96 \times 10^4$  dm<sup>3</sup>/mol за једињење **3**,  $4,35 \times 10^4$  dm<sup>3</sup>/mol за једињење **4** и  $4,19 \times 10^4$  dm<sup>3</sup>/mol за једињење **5**, и указују на прилично исту могућност везивања сва три нафтохинона за молекул ДНК.



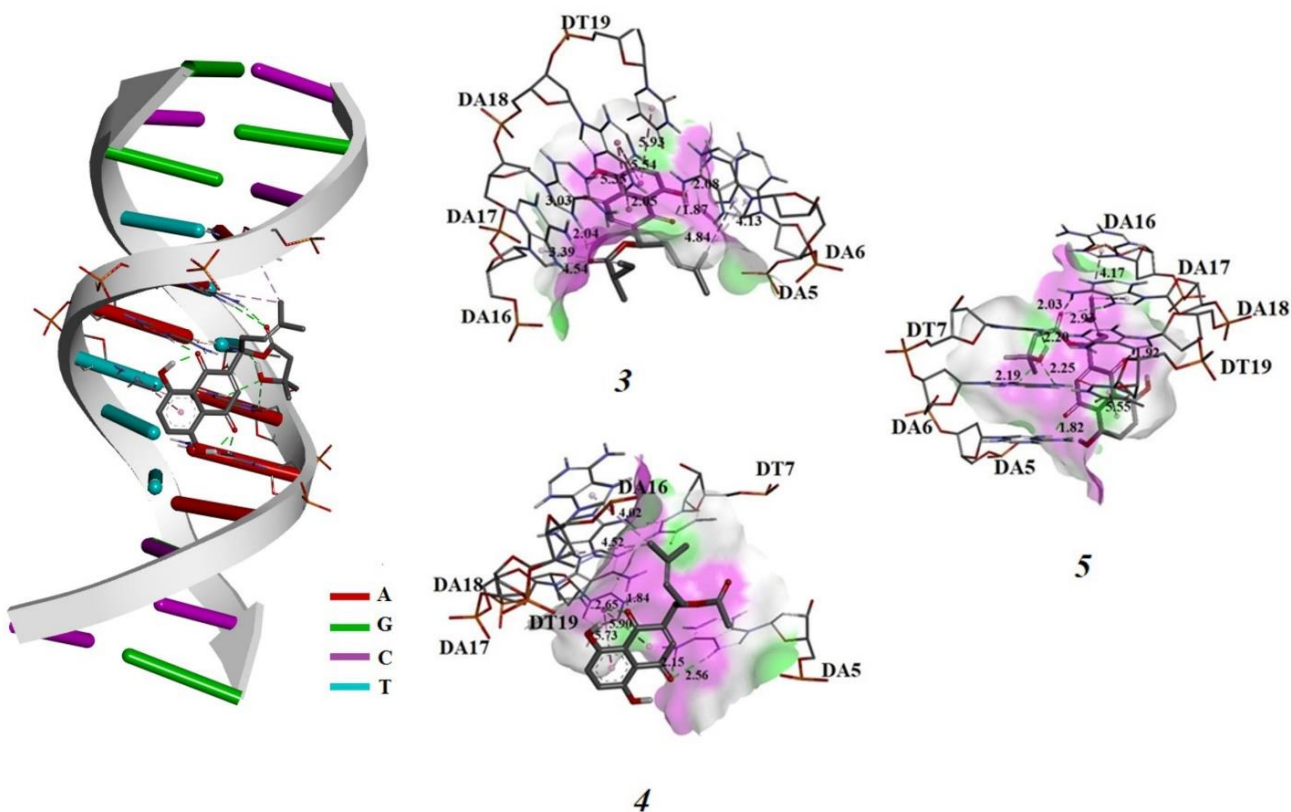


**Слика 4.65.** Емисиони спектар Hoechst-ДНК (Hoechst ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) и ДНК ( $1,66 \times 10^{-5}$  M)), у одсуству (плава линија) и присуству увећаних концентрација  $\alpha$ -метилбутирилишконина (3), ацетилишконина (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5) (0 до  $2,4 \times 10^{-5}$  M). Стрелица показује промену апсорбанце након додавања увећаних концентрација  $\alpha$ -метилбутирилишконина (3), ацетилишконина (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5). Десно: одговарајући Стерн-Волмерови дијаграми.

#### 4.11.1.3. Молекулска докинг симулација

У испитивању интеракција тестираних нафтохинона 3, 4 и 5 користили смо и молекулску докинг симулацију, при чему је одређена енергија везивања, а предвиђена су и потенцијална места везивања нафтохинона за молекул ДНК. На основу резултата

молекулског докинга добијени су најстабилнији конформери са најнижом слободном енергијом везивања. Добијене вредности енергије интеракције ( $E_i$ ), константе инхибиције ( $K_i$ ), слободне енергије везивања ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ), као и нековалентне интеракције испитиваних модела представљене су у Табела П5., а најстабилније конформације комплекса нафтохинона 3, 4 и 5 са молекулом ДНК представљене су на Слика 4.66..



Слика 4.66. Интеракције између нафтохинона 3, 4 и 5 и молекула ДНК. Конвенционалне водоничне везе представљене су зеленим, а хидрофобне интеракције љубичастим испрекиданом линијама.

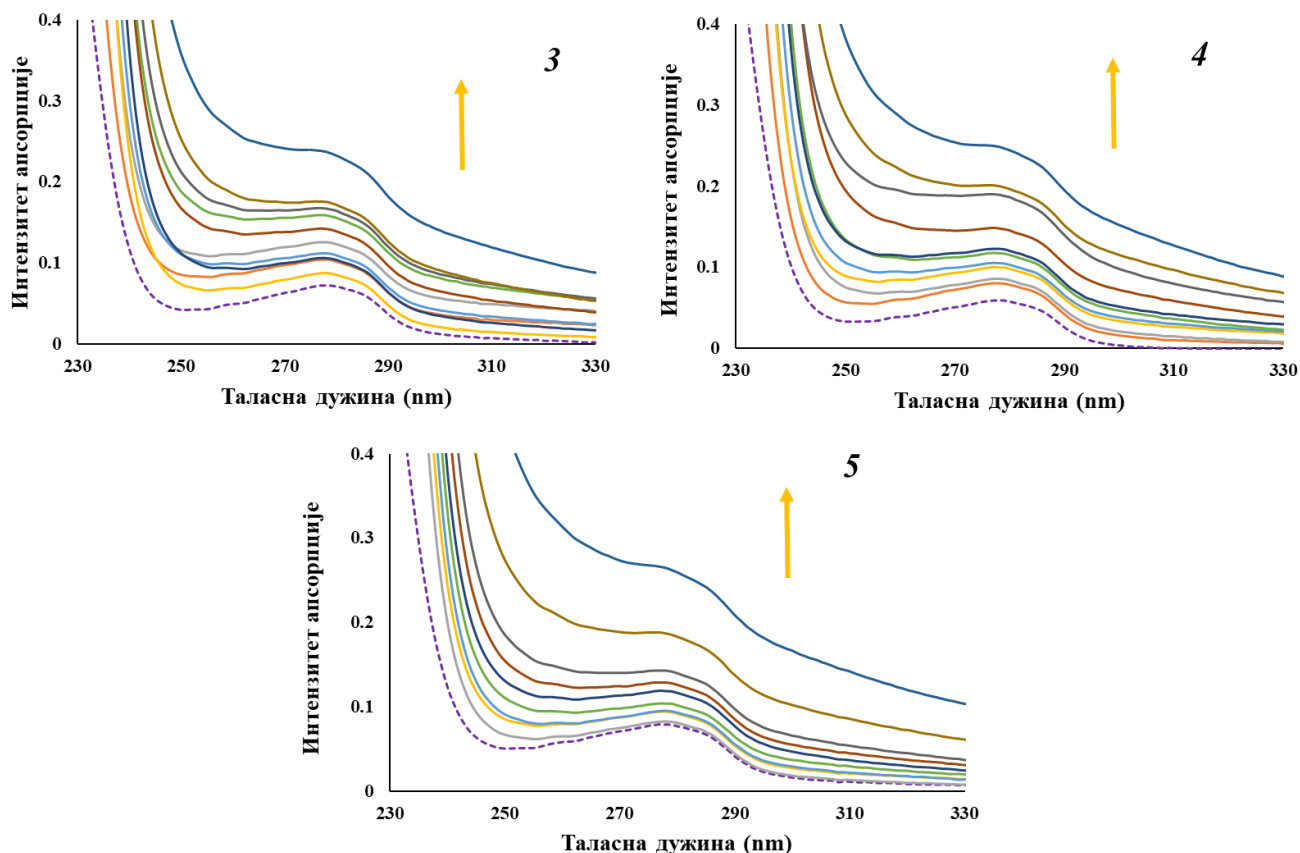
Добијени резултати приказани на Слика 4.66. показују да се нафтохинони везују у регији малог жлеба богатој аденином и тимином преко конвенционалних водоничних и  $\pi$ -алкил веза, као најзначајнијих нековалентних интеракција (Табела П5.). За релативне енергије везивања нафтохинона 3, 4, и 5 са молекулом ДНК добијене су вредности -22,99, -20,98, и -20,31 kJ/mol. Добијени резултати су у складу са експерименталним резултатима добијеним применом UV-Vis и флуоресцентне спектроскопије према којима сва три тестирана нафтохинона имају сличан афинитет везивања за жлеб између ланаца у молекулу ДНК.

#### 4.11.2. Интеракције нафтохинона 3, 4 и 5 са молекулом HSA

Испитивање интеракција између протеина и лека у блиској је вези са ефикасношћу самог лека у третманима многих болести<sup>189,190</sup>. Дистрибуција, транспорт и метаболизам лека јако зависе од њихове могућности да се вежу за протеине попут хуманог серум албумина (HSA)<sup>191,192</sup>. На основу тога, како би утврдили да ли нафтохинони 3, 4 и 5 могу да се транспортују кроз организам, испитивали смо и њихове интеракције са протеином HSA (хумани серум албумин). Приликом испитивања коришћене су методе флуоресцентне и UV-Vis спектроскопије, као и молекулска докинг анализа.

##### 4.11.2.1. UV-Vis спектроскопска мерења

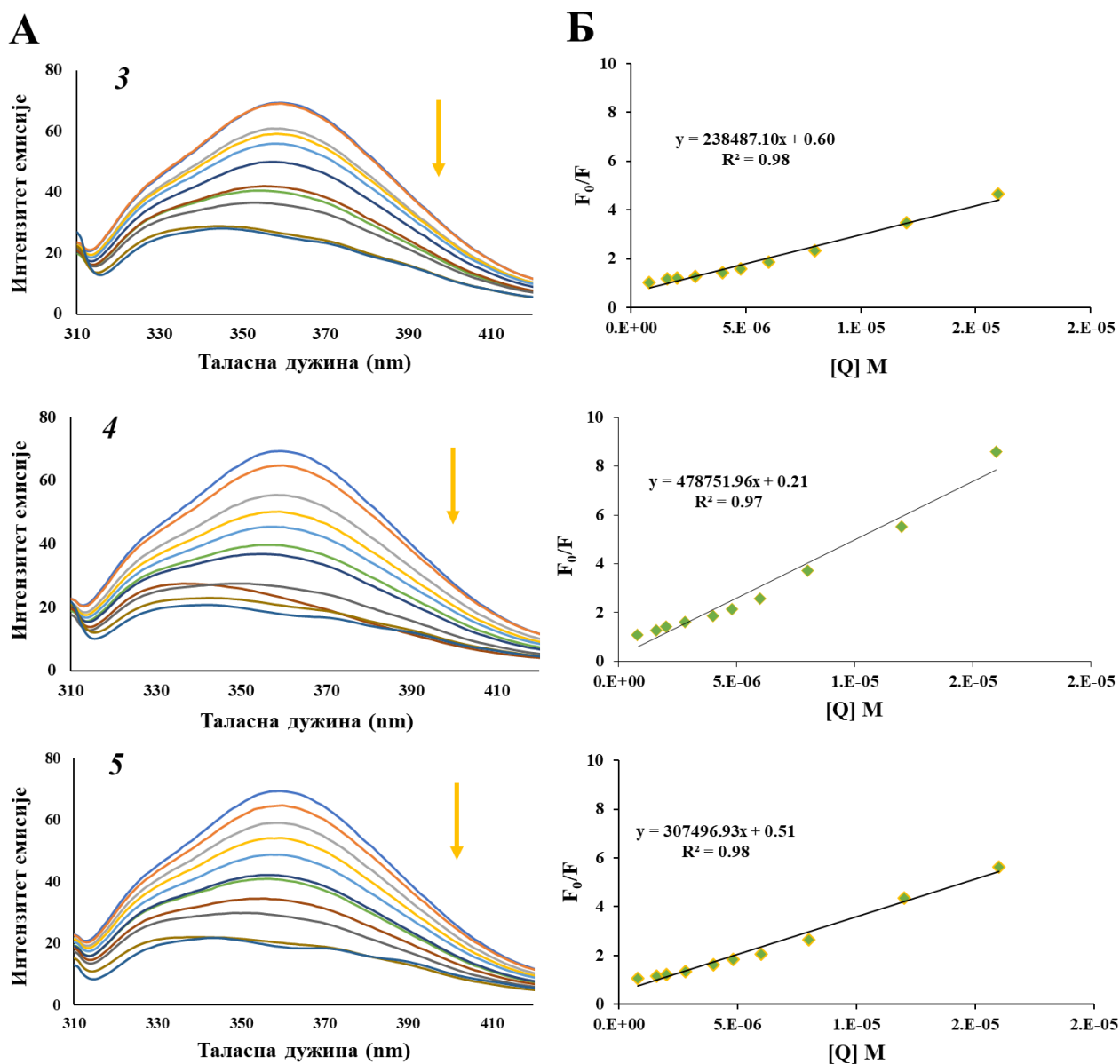
Електронском апсорпционом спектроскопијом праћена је реакција титрације протеина HSA са увећаним концентрацијама раствора нафтохинона 3, 4 и 5, а добијени апсорпциони спектри представљени су на *Слика 4.67.* Молекул HSA у електронском апсорпционом спектру показује максимум на таласној дужини од око 280 nm као резултат кумулативних  $\pi$ - $\pi^*$  прелаза услед присуства аминокиселинских остатака триптофана, тирозина и фенилаланина<sup>193,194</sup>. Из представљених резултата примећено је континуално смањење интензитета апсорпционог максимума раствора молекула HSA на 280 nm приликом додавања увећаних концентрација тестираних нафтохинона. Хипохромни ефекат је окарактерисана као резултат промена локалног окружења у молекулу HSA<sup>191</sup>.



**Слика 4.67.** Апсорпциони спектар HSA ( $2,00 \times 10^{-6} M$ ) пре (љубичаста испрекидана линија) и спектри након додавања увећаних концентрација раствора  $\alpha$ -метилбутирилишконина (3), ацетилишконина (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5) ( $0 - 1,60 \times 10^{-5} M$ ). Стрелица указује на промену апсорпције након додавања увећаних концентрација раствора 3, 4 и 5.

#### 4.11.2.2. Флуоресцентна спектроскопска мерења

Како би даље потврдили резултате добијене електронском апсорпционом спектроскопијом, реакцију титрације протеина HSA изабраним нафтохинонима пратили смо флуоресцентном спектроскопијом. Смањење интензитета или померање емисионог максимума протеина у присуству увећаних концентрација малог молекула може бити приписан формирању новог комплекса, трансферу енергије или реакцијама побуђених стања<sup>195</sup>. Услед присуства аминокиселинског остатка Trp-214, HSA показује емисиони максимум на 360 nm након ексцитације на 295 nm. На основу наведеног, праћене су промене у емисионом спектру HSA у опсегу од 300 nm до 450 nm пре и након додавања увећаних концентрација нафтохинона 3, 4 и 5, а добијени спектри представљени су на Слика 4.68.А.



**Слика 4.68.** (А) Флуоресцентни емисиони спектар протеина HSA ( $2,00 \times 10^{-6} M$ ), пре (плава линија) и након додавања увећаних концентрација раствора  $\alpha$ -метилбутирилишконина (3), ацетилишконина (4) и  $\beta$ -хидроксиизовалерилишконина (5) (од 0 до  $1,6 \times 10^{-5} M$ ) (Б) Одговарајући Стерн-Волмерови дијаграми.

Са представљене слике уочава се смањење интензитета флуоресценције HSA услед пораста концентрације тестираних нафтохинона, које је праћено и малим померањем ка краћим таласним дужинама. Добијени резултати указују на промене у локалном окружењу аминокиселинског остатака Trp-214 у молекулу HSA, који су највероватније последица

формирања не-флуоресцентног комплекса HSA-нафтохинон<sup>196</sup>. Представљени резултати су у складу са претходно објављеним литератирним подацима за шиконин<sup>197</sup>.

Обрадом добијених резултата (Слика 4.68.Б) израчунате су Стерн-Волмерова (Stern–Volmer) константе гашења  $K_{SV}$  и  $K_q$ , број везивних места у молекулу протеина ( $n$ ) и константа везивања ( $K_b$ ), и представљене су у Табела 4.6..

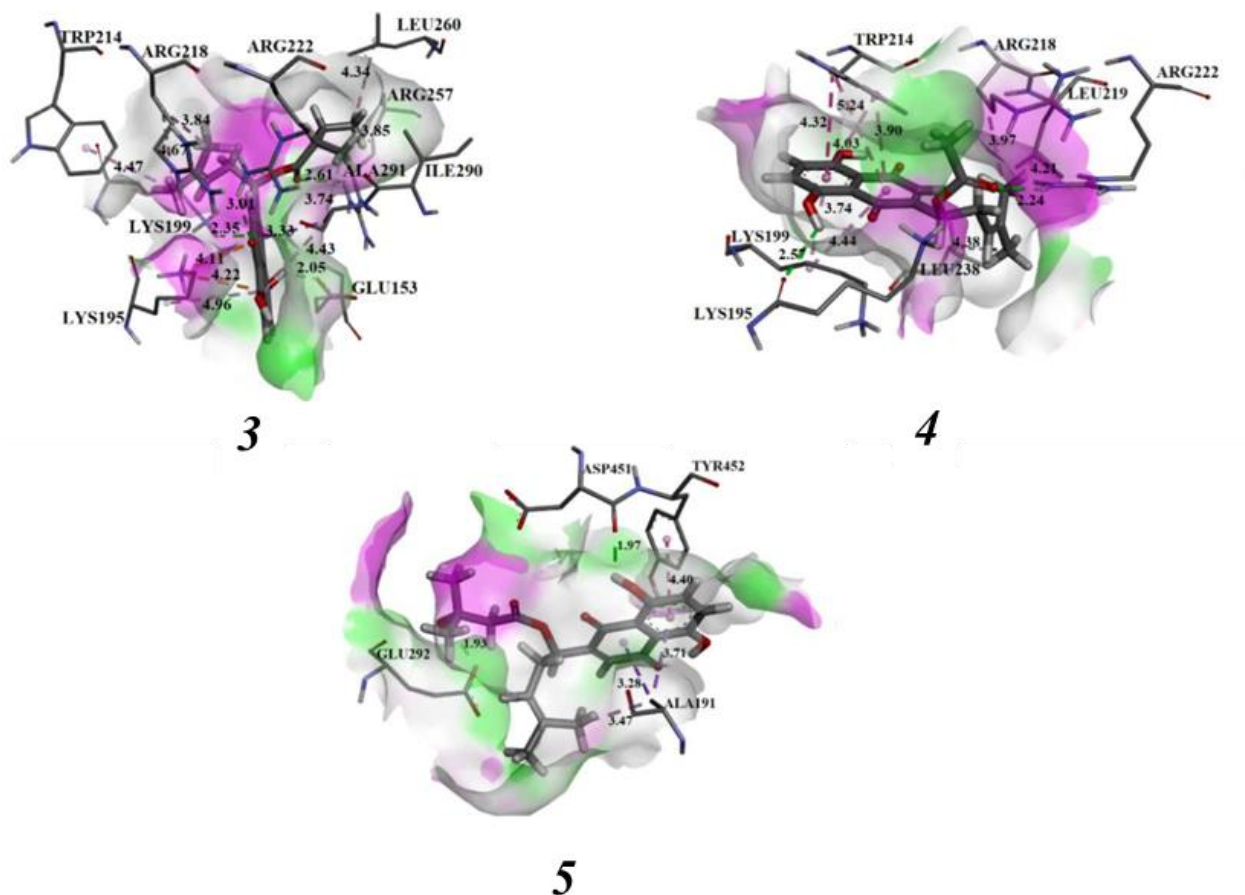
**Табела 4.6.** Константе гашења флуоресценције, константе везивања и број везивних места код интеракција нафтохинона **3**, **4** и **5** са хуманим серум албумином (HSA)

Једињење	$K_{sv}$ ( $dm^3/mol$ )	$K_q$ ( $dm^3/mol s$ )	$K_b$ ( $dm^3/mol$ )	$n$
$\alpha$ - метилбутирилшиконин ( <b>3</b> )	$2,38 \times 10^5$	$2,38 \times 10^{13}$	$2,42 \times 10^7$	1,43
ацетилшиконин ( <b>4</b> )	$4,79 \times 10^5$	$4,79 \times 10^{13}$	$4,17 \times 10^7$	1,41
$\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин ( <b>5</b> )	$3,07 \times 10^5$	$3,07 \times 10^{13}$	$3,63 \times 10^7$	1,44

Вредности константе  $K_{SV}$  реда величине  $10^5 dm^3/mol$  указују на јак афинитет сва три нафтохинона да се вежу за протеин, док вредности константе  $K_q$  које су реда величине  $10^{13} dm^3/mol s$  указују на то да је формирање комплекса HSA-нафтохинон статички процес<sup>191,198</sup>. Број везивних места који је  $\sim 1$  за сва три једињења говори о томе да се при формирању не-флуоресцентног комплекса нафтохинони везују за једно место у структури протеина. На основу вредности за константе везивања ( $K_b$ ) може се закључити да се ацетилшиконин (**4**) најјаче везује за молекул протеина у поређењу са преостала два тестирана нафтохинона.

#### 4.11.2.3. Молекулска докинг симулација

Приликом испитивања интеракција тестираних нафтохинона **3**, **4** и **5** са протеином HSA користили смо и молекулску докинг симулацију. Овом методом одређена је енергија везивања, а предвиђена су и потенцијална места везивања протеина HSA са нафтохинонима. На основу резултата молекулског докинга добијени су најстабилнији конформери са најнижом слободном енергијом везивања. Добијене вредности енергије интеракције ( $E_i$ ), константе инхибиције ( $K_i$ ), слободне енергије везивања ( $\Delta G_{bind}$ ) као и нековалентне интеракције испитиваних модела представљене су у Табела Пб., а најстабилније конформације комплекса нафтохинона **3**, **4** и **5** са молекулом HSA представљене су на Слика 4.69..



Слика 4.69. Интеракције између нафтохинона **3**, **4** и **5** и аминокиселина протеина HSA. Конвенционалне водоничне везе обележене су љубичастим испрекиданим линијама.

Како тестирани нафтохинони садрже у својој структури поларне групе и то: две естарске, две карбонилне и три хидроксилне, број могућих интеракција са аминокиселинама протеина HSA је јако велики. Из резултата представљених у Табела Пб. јасно се види да је конвенционална водонична веза најважнији тип интеракција између протеина и нафтохинона, а поред њих значајније не ковалентне интеракције су алкил- $\pi$ ,  $\sigma$ - $\pi$ ,  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -катион. Све дужине водоничних веза су у опсегу од 1,5 – 3,0 Å, док су дужине осталих веза нешто краће ( $\geq 3$  Å). Релативне слободне енергије везивања за једињења **3**, **4** и **5** за молекул HSA су - 13,17, - 29,08, и - 7,74 kJ/mol. Ови резултати су у складу са резултатима експерименталне анализе добијеним применом флуоресцентне спектроскопије на основу којих је закључено да ацетилшиконин (**4**) формира стабилнији комплекс са молекулом протеина од нафтохинона **3** и **5**.

#### 4.12. Антибактеријска активност изолованих нафтохинона

Антибактеријска активност изолованих нафтохинони *I-7* испитивана је на пет грам позитивних и пет грам негативних бактерија употребом микродилуционе методе. Резултати теста приказани су као вредности минималних инхибиторних концентрација (MIC<sub>50</sub> и MIC<sub>90</sub>) испитиваних једињења у µg/mL, и представљени су у *Табела 4.7.* и *Табела 4.8.* Такође, представљена је и резистентност употребљених тест бактерија на одређене антибиотике а резултати су приказани у *Табела 4.9.*

На основу резултата приказаних у *Табела 4.7.* и *Табела 4.8.*, изоловани нафтохинони *I-7* показали су антимикуробну активност са минималним инхибиторним концентрацијама у опсегу 4,27 µg/mL - 68,27 µg/mL за MIC<sub>50</sub> и 4,77 µg/mL - 76,20 µg/mL за MIC<sub>90</sub>.

**Табела 4.7.** Антибактеријска активност изолованих нафтохинона *I-7* (MIC<sub>50</sub>)

Бактерије	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> вредности за једињења <i>I-7</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
	µg/mL						
грам позитивне							
<i>B. megaterium</i>	12,79 ± 0,56	34,13 ± 0,65	12,79 ± 0,33	8,53 ± 0,29	34,13 ± 0,55	34,13 ± 0,42	51,07 ± 0,36
<i>E. faecalis</i>	34,13 ± 0,44	25,58 ± 0,33	6,40 ± 0,99	8,53 ± 0,45	12,79 ± 0,19	34,13 ± 0,45	25,58 ± 0,29
<i>M. arborescens</i>	34,13 ± 0,23	25,58 ± 0,28	12,79 ± 1,26	6,40 ± 0,12	17,07 ± 0,22	51,07 ± 0,35	34,13 ± 0,33
<i>M. luteus</i>	68,27 ± 0,19	25,58 ± 0,11	12,79 ± 1,13	8,53 ± 0,19	34,13 ± 0,18	51,07 ± 0,21	51,07 ± 0,28
<i>S. epidermidis</i>	34,13 ± 0,29	34,13 ± 0,25	8,53 ± 0,35	8,53 ± 0,15	34,13 ± 0,23	51,07 ± 0,33	51,07 ± 0,29
грам негативне							
<i>C. koseri</i>	34,13 ± 0,65	17,07 ± 0,15	6,40 ± 0,17	8,53 ± 0,17	68,27 ± 0,66	34,13 ± 0,29	17,07 ± 0,16
<i>H. alvei</i>	51,07 ± 0,39	51,07 ± 0,36	8,53 ± 0,17	6,40 ± 0,09	34,13 ± 0,32	34,13 ± 0,21	17,07 ± 0,14
<i>P. proteolytica</i>	34,13 ± 0,33	17,07 ± 0,21	6,40 ± 0,29	4,27 ± 0,06	17,07 ± 0,13	68,27 ± 0,64	34,13 ± 0,29
<i>S. maltophilia</i>	34,13 ± 0,29	12,79 ± 0,09	4,27 ± 0,22	6,40 ± 0,14	34,13 ± 0,18	68,27 ± 0,77	68,27 ± 0,63
<i>Y. intermedia</i>	25,58 ± 0,21	25,58 ± 0,16	6,40 ± 0,16	6,40 ± 0,12	68,27 ± 0,26	68,27 ± 0,56	12,79 ± 0,15

<sup>1</sup>MIC<sub>50</sub> вредност је представљена као средња вредност ± SD од 8 мерења



Табела 4.8. Антибактеријска активност изолованих нафтохинона 1-7 (MIC<sub>90</sub>)

Бактерије	<sup>1</sup> MIC <sub>90</sub> вредности за једињења 1-7						
	1	2	3	4	5	6	7
µg/mL							
грам позитивне							
<i>B. megaterium</i>	13,60 ± 0,61	38,10 ± 0,69	13,60 ± 0,35	9,54 ± 0,30	38,10 ± 0,58	38,10 ± 0,46	54,28 ± 0,39
<i>E. faecalis</i>	38,10 ± 0,46	27,20 ± 0,36	6,82 ± 1,12	9,54 ± 0,48	13,60 ± 0,23	38,10 ± 0,46	27,20 ± 0,30
<i>M. arborescens</i>	38,10 ± 0,29	27,20 ± 0,29	13,60 ± 1,28	6,82 ± 0,16	19,05 ± 0,26	54,28 ± 0,39	38,10 ± 0,38
<i>M. luteus</i>	76,20 ± 0,22	27,20 ± 0,13	13,60 ± 1,16	9,54 ± 0,22	38,10 ± 0,19	54,28 ± 0,26	54,28 ± 0,29
<i>S. epidermidis</i>	38,10 ± 0,35	38,10 ± 0,28	9,54 ± 0,39	9,54 ± 0,17	38,10 ± 0,29	54,28 ± 0,33	54,28 ± 0,31
грам негативне							
<i>C. koseri</i>	38,10 ± 0,66	19,05 ± 0,19	6,82 ± 0,19	9,54 ± 0,18	76,20 ± 0,87	38,10 ± 0,33	19,05 ± 0,18
<i>H. alvei</i>	54,28 ± 0,48	54,28 ± 0,37	9,54 ± 0,18	6,82 ± 0,10	38,10 ± 0,33	38,10 ± 0,23	19,05 ± 0,15
<i>P. proteolytica</i>	38,10 ± 0,35	19,05 ± 0,23	6,82 ± 0,26	4,77 ± 0,08	19,05 ± 0,13	76,20 ± 0,75	38,10 ± 0,35
<i>S. maltophilia</i>	38,10 ± 0,31	13,60 ± 0,12	4,77 ± 0,23	6,82 ± 0,19	38,10 ± 0,19	76,20 ± 0,79	76,20 ± 0,66
<i>Y. intermedia</i>	27,20 ± 0,22	27,20 ± 0,17	6,82 ± 0,18	6,82 ± 0,13	76,20 ± 0,29	76,20 ± 0,59	13,60 ± 0,17

<sup>1</sup>MIC<sub>90</sub> вредност је представљена као средња вредност ± SD од 8 мерења

Према литературним подацима једињења код којих је MIC вредност једнака или мања од 16 µg/mL могу се сматрати релевантним за клиничку употребу<sup>199</sup>. Имајући у виду ову чињеницу, међу тестираним грам позитивним бактеријама, бактерија *B. megaterium* (резистентна на деловање еритромицина, ампицилина и ванкомицина) осетљива је на деловање нафтохинона 1, 3 и 4. *E. faecalis* резистентна на ампицилин и ванкомицин показала је осетљивост на деловање 3, 4 и 5. Преостале три грам позитивне бактерије *M. arborescens*, *M. luteus* и *S. epidermidis* показале су осетљивост према једињењима 3 и 4. Међу грам негативним бактеријама, моропенем резистентна *S. maltophilia* показала је осетљивост на изолована једињења 2, 3 и 4, док су остале грам негативне бактерије осетљиве на деловање 3 и 4.

Резултати које су објавили Папагеоргиоу (Papageorgiou) и Андужар (Andujar) са сарадницима указују на значајну антибактеријску активност шиконинских деривата на грам позитивне бактеријске сојеве, док је на грам негативне бактеријске сојеве активност шиконинских деривата слабија<sup>56,62</sup>. Супротно овим резултатима студије Бригама (Brigham) и Динга (Ding) показале су да шиконински деривати показују и добру активност према бактеријама грам негативних врста. Приликом интерпретације ових резултата, свакако у обзир треба узети значајност у разлици примењене методе за мерење вредности MIC<sup>200,201</sup>.

На основу наших резултата представљених у Табела 4.7. и Табела 4.8. може се закључити да изоловани нафтохинони показују добру антибактеријску активност како према грам позитивним, тако и према грам негативним бактеријским сојевима. Од тестираних нафтохинона посебно се издвајају  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3) и ацетилшиконин (4), који су показали најзначајнију активност према свим тестираним бактеријским сојевима. Уочене MIC<sub>50</sub> и MIC<sub>90</sub> вредности за једињења 3 и 4 за грам позитивне бактерије су у опсегу 6,40  $\mu\text{g/mL}$  - 12,79  $\mu\text{g/mL}$  и 6,82  $\mu\text{g/mL}$  - 13,60  $\mu\text{g/mL}$ , док су за грам негативне бактеријске сојеве у опсегу од 4,27  $\mu\text{g/mL}$  - 8,53  $\mu\text{g/mL}$  и 4,77  $\mu\text{g/mL}$  - 9,54  $\mu\text{g/mL}$ , на основу чега се може закључити да ова два деривата шиконина показују мало бољу активност према грам негативним бактеријама. Нафтохинон  $\alpha$ -метилбутирилшиконин (3) најбољу активност испољава према грам позитивној *E. faecalis* (MIC<sub>50</sub> 6,40  $\mu\text{g/mL}$  и MIC<sub>90</sub> 6,82  $\mu\text{g/mL}$ ), као и према грам негативној *S. maltophilia* (MIC<sub>50</sub> 4,27  $\mu\text{g/mL}$  и MIC<sub>90</sub> 4,77  $\mu\text{g/mL}$ ), док је ацетилшиконин (4) најбољу активност показао према грам позитивној *M. arborescens* (MIC<sub>50</sub> 6,40  $\mu\text{g/mL}$  и MIC<sub>90</sub> 6,82  $\mu\text{g/mL}$ ) и грам негативној *P. proteolytica* (MIC<sub>50</sub> 4,27  $\mu\text{g/mL}$  и MIC<sub>90</sub> 4,77  $\mu\text{g/mL}$ ).

Наши резултати су показали да је ампицилин резистентна *Y. intermedia* осетљива на деловање једињења 7, диметокси деривата деоксишиконина (MIC<sub>50</sub> 12,79  $\mu\text{g/mL}$  и MIC<sub>90</sub> 13,60  $\mu\text{g/mL}$ ), што је супротно од претходно објављене студије која је показала да се алкиловањем фенолне групе смањује активност код ове групе једињења<sup>56</sup>.

Табела 4.9. Резистентност тестираних бактерија на одређене антибиотике

Бактерије	μg/mL										
	<sup>1</sup> GEN	<sup>2</sup> ERI	<sup>3</sup> AMP	<sup>4</sup> TETc	<sup>5</sup> IMPe	<sup>6</sup> MEM	<sup>7</sup> PIP	<sup>8</sup> TGC	<sup>9</sup> VAN	<sup>10</sup> NOR	<sup>11</sup> CHL
<sup>12</sup> МИС <sub>50</sub> вредности за тестиране антибиотике											
грам позитивне											
<i>B. megaterium</i>	4,55 ± 0,15	48,95 ± 1,21	94,23 ± 1,35	1,21 ± 0,01	4,65 ± 0,21	7,69 ± 0,11	7,71 ± 0,09	7,62 ± 0,11	98,55 ± 1,12	4,59 ± 0,03	5,23 ± 0,14
<i>E. faecalis</i>	4,56 ± 0,08	6,11 ± 0,05	99,55 ± 0,78	5,12 ± 0,09	8,55 ± 0,11	4,99 ± 0,14	5,54 ± 0,12	0,59 ± 0,03	110,10 ± 1,36	0,41 ± 0,01	6,12 ± 0,11
<i>M. arborescens</i>	0,99 ± 0,01	95,22 ± 0,99	107,98 ± 0,97	5,12 ± 0,05	5,11 ± 0,13	13,55 ± 0,11	6,60 ± 0,11	14,55 ± 0,26	78,12 ± 1,24	8,80 ± 0,25	16,44 ± 0,36
<i>M. luteus</i>	5,21 ± 0,07	151,29 ± 1,64	6,12 ± 0,06	5,88 ± 0,13	5,88 ± 0,15	8,11 ± 0,09	11,23 ± 0,09	11,33 ± 0,13	16,40 ± 0,23	5,50 ± 0,18	79,40 ± 1,89
<i>S. epidermidis</i>	111,11 ± 0,97	117,77 ± 1,11	84,12 ± 0,16	90,50 ± 1,35	13,56 ± 0,11	5,22 ± 0,11	12,20 ± 0,06	5,10 ± 0,06	4,62 ± 0,18	11,69 ± 0,34	15,50 ± 0,26
грам негативне											
<i>C. koseri</i>	4,98 ± 0,13	5,13 ± 0,19	91,12 ± 1,34	7,85 ± 0,17	0,56 ± 0,01	2,12 ± 0,06	9,78 ± 0,13	0,33 ± 0,02	15,10 ± 0,18	12,20 ± 0,15	5,50 ± 0,16
<i>H. alvei</i>	8,11 ± 0,07	8,55 ± 0,09	89,33 ± 0,89	6,11 ± 0,07	0,79 ± 0,01	0,51 ± 0,01	12,66 ± 0,45	0,65 ± 0,01	17,25 ± 0,12	14,20 ± 0,13	5,05 ± 0,06
<i>P. proteolytica</i>	86,88 ± 1,33	12,55 ± 0,19	6,30 ± 0,03	4,57 ± 0,09	1,11 ± 0,06	1,68 ± 0,16	91,12 ± 1,65	7,56 ± 0,06	6,88 ± 0,11	8,99 ± 0,15	12,11 ± 0,13
<i>S. maltophilia</i>	4,56 ± 0,06	6,88 ± 0,04	5,88 ± 0,03	1,12 ± 0,08	0,96 ± 0,03	111,11 ± 1,33	16,25 ± 0,22	5,97 ± 0,15	11,10 ± 0,08	0,56 ± 0,02	9,80 ± 0,21
<i>Y. intermedia</i>	5,77 ± 0,12	11,11 ± 0,14	111,25 ± 1,39	5,41 ± 0,07	1,45 ± 0,07	1,13 ± 0,07	11,25 ± 0,16	0,71 ± 0,02	16,10 ± 0,19	5,40 ± 0,07	16,30 ± 0,21
<sup>13</sup> МИС <sub>90</sub> вредности за тестиране антибиотике											
грам позитивне											
<i>B. megaterium</i>	4,98 ± 0,17	89,25 ± 1,31	135,65 ± 1,22	1,29 ± 0,03	5,05 ± 0,22	8,16 ± 0,12	7,89 ± 0,11	8,45 ± 0,12	140,10 ± 1,19	4,77 ± 0,04	6,24 ± 0,16
<i>E. faecalis</i>	4,69 ± 0,09	8,25 ± 0,06	136,69 ± 0,89	7,69 ± 0,14	15,11 ± 0,16	7,16 ± 0,16	9,12 ± 0,15	0,85 ± 0,05	160,54 ± 1,59	0,52 ± 0,03	6,99 ± 0,12
<i>M. arborescens</i>	1,22 ± 0,03	119,88 ± 1,31	149,88 ± 1,16	6,63 ± 0,07	7,19 ± 0,19	16,22 ± 0,17	11,80 ± 0,12	21,68 ± 0,29	116,20 ± 1,46	14,25 ± 0,35	21,50 ± 0,38
<i>M. luteus</i>	6,31 ± 0,13	159,63 ± 1,66	7,55 ± 0,07	7,15 ± 0,17	8,52 ± 0,17	14,55 ± 0,13	18,10 ± 0,18	20,40 ± 0,18	25,55 ± 0,28	9,87 ± 0,23	99,55 ± 1,96
<i>S. epidermidis</i>	153,11 ± 0,13	138,11 ± 1,16	99,09 ± 0,18	135,44 ± 1,39	18,99 ± 0,12	5,89 ± 0,17	18,99 ± 0,08	7,56 ± 0,09	5,05 ± 0,26	18,60 ± 0,39	17,58 ± 0,28
грам негативне											
<i>C. koseri</i>	6,56 ± 0,14	5,23 ± 0,20	113,15 ± 1,41	10,14 ± 0,18	0,78 ± 0,03	3,15 ± 0,08	16,65 ± 0,21	0,51 ± 0,03	17,25 ± 0,19	18,21 ± 0,17	5,90 ± 0,18
<i>H. alvei</i>	8,89 ± 0,08	11,49 ± 1,00	134,54 ± 0,22	7,56 ± 0,07	0,86 ± 0,02	0,55 ± 0,02	17,55 ± 0,51	0,78 ± 0,02	24,44 ± 0,13	22,41 ± 0,18	5,43 ± 0,08
<i>P. proteolytica</i>	99,61 ± 1,36	16,54 ± 0,21	6,73 ± 0,04	6,11 ± 0,13	1,53 ± 0,08	1,99 ± 0,17	131,16 ± 1,71	7,99 ± 0,07	12,40 ± 0,15	17,45 ± 0,16	14,40 ± 0,14
<i>S. maltophilia</i>	5,05 ± 0,08	7,55 ± 0,05	7,12 ± 0,05	1,29 ± 0,09	1,54 ± 0,09	139,55 ± 1,36	19,36 ± 0,23	8,12 ± 0,19	17,10 ± 0,09	0,77 ± 0,03	10,56 ± 0,29
<i>Y. intermedia</i>	7,03 ± 0,13	16,87 ± 0,18	137,12 ± 1,40	5,82 ± 0,08	2,11 ± 0,09	1,78 ± 0,08	12,88 ± 0,18	0,79 ± 0,03	18,55 ± 0,23	9,80 ± 0,09	19,54 ± 0,27

<sup>1</sup>GEN-Гентамицин. <sup>2</sup>ERI-Еритромицин. <sup>3</sup>AMP-Ампицилин. <sup>4</sup>TETc-Тетрациклин. <sup>5</sup>IMPe-Импипенем. <sup>6</sup>MEM-Меропенем. <sup>7</sup>PIP-Пиперацилин. <sup>8</sup>TGC-Тигецилин. <sup>9</sup>VAN-Ванкомицин. <sup>10</sup>NOR-Норфлоксацин. <sup>11</sup>CHL-Хлорамфеникол. <sup>12</sup>МИС<sub>50</sub> и <sup>13</sup>МИС<sub>90</sub> вредности су представљене као средња вредност ± SD од 8 мерења

### 4.13. Синтеза и структурна карактеризација инклузионог комплекса 4/ $\beta$ -CD

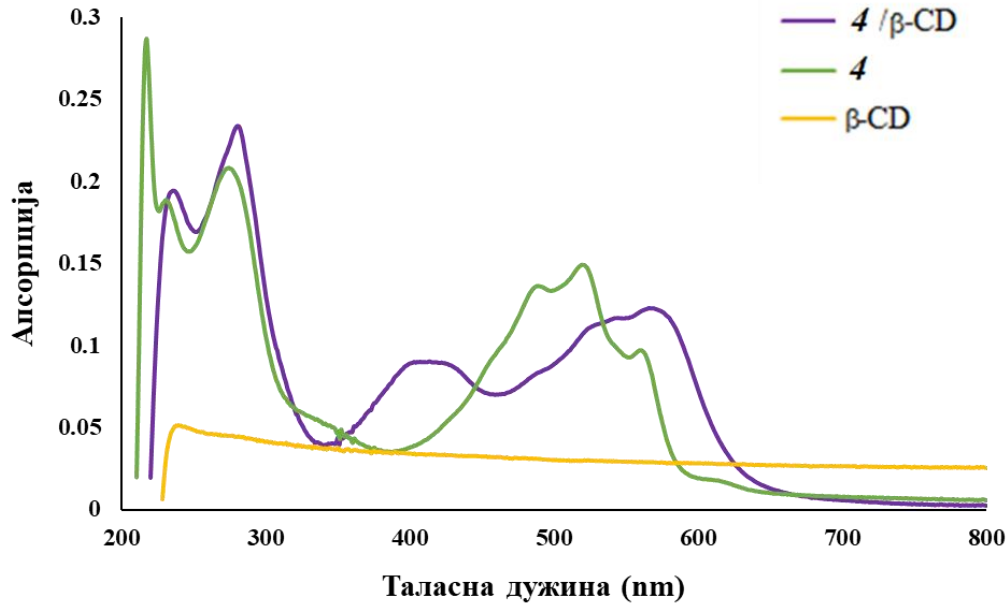
Липофилна природа изолованих нафтохинона значајно утиче на њихову биорасположивост и фармацеутску ефикасност. Поред тога треба нагласити да светлост и присуство кисеоника имају значајан утицај на стабилност нафтазарина, а производи настали оваквим распадом показују ниске биолошке активности<sup>56</sup>. Како би превазишли представљене проблеме, приликом израде ове докторске дисертације, искористили смо могућност енкапсулације нафтохинона у молекулу  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD).

Како је од свих тестираних нафтохинона ацетилшиконин (**4**) показао најбољу активност, одлучили смо да испитамо могућност његове енкапсулације у молекулу  $\beta$ -CD. Бинарни систем 4/ $\beta$ -CD добијен је методом копреципитације, а његова карактеризација извршена је употребом UV-Vis, IR и <sup>1</sup>H NMR спектроскопије, као и рендгенском дифрактометријом праха (XPRD). Морфологија као и особине површине формираног бинарног система одређене су скенирајућом електронском микроскопијом (SEM). Такође, тестом фазне растворљивости одредили смо стехиометријски однос нафтохинона **4** заробљеног у  $\beta$ -CD у оквиру бинарног система 4/ $\beta$ -CD, као и одговарајућу константу стабилности насталог бинарног система.

#### 4.13.1. UV-Vis спектрална анализа

Електронски апсорпциони спектри слободног ацетилшиконина (**4**), слободног  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD), као и бинарног система ове две компоненте (4/ $\beta$ -CD) снимљени су у метанолу и представљени на *Слика 4.70.*

Са представљених спектра (*Слика 4.70.*), а у складу са литературом,  $\beta$ -циклодекстрин не показује апсорпцију у спектралној области од 200 nm до 800 nm<sup>202</sup>. Незасићени систем нафтохиноноског дела молекула ацетилшиконина индукује појаву више апсорпционих максимума у ултраљубичастом делу спектра, и то на 217 nm, 231 nm и 274 nm, као и у видљивом делу спектра на 488 nm, 519 nm и 560 nm.



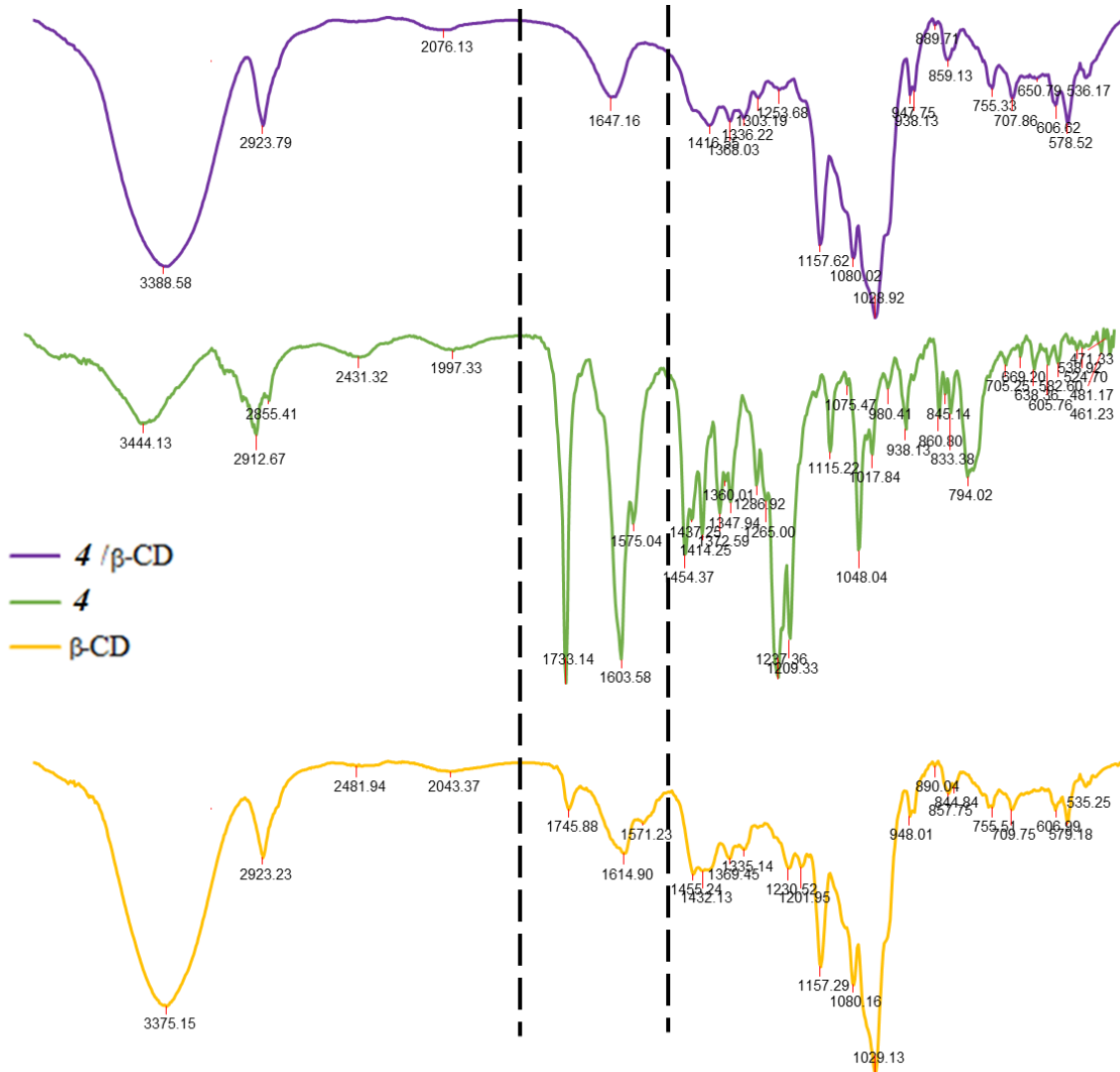
Слика 4.70. Апсорпциони спектри слободног ацетилшиконина (**4**),  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (**4**/ $\beta$ -CD).

У спектру бинарног система који се састоји од **4** и  $\beta$ -CD, примећено је батохромно померање два апсорпциона максимума у ултраљубичастом делу спектра у односу на спектар слободног ацетилшиконина, и то на 236 nm и 281 nm. Такође, у видљивом делу спектра примећено је плаво померање максимума на 414 nm (у спектру ацетилшиконина овај максимум апсорпције се налази на 488 nm), као и два црвена померања апсорпционих максимума на 544 nm и 566 nm (у спектру ацетилшиконина ови максимуми апсорпције се налазе на 519 nm и 560 nm). Ова померања апсорпционих максимума се приписују пертурбацијама електронских густина унутар гост-молекула, а као резултат гост-домаћин хидрофобних интеракција између ацетилшиконина (гост) са хидрофобним унутрашњим слојем цикличног олигосахарида  $\beta$ -циклодекстрина (домаћин) који облаже рупу у којој је овај нафтохинон енкапсулиран <sup>203</sup>.

#### 4.13.2. FT-IC спектрална анализа

Инфрацрвени апсорпциони спектри слободног ацетилшиконина (**4**), слободног  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD), као и инклузионог комплекса ове две компоненте (**4**/ $\beta$ -CD) представљени су на Слика 4.71.. Поређењем таласних бројева и интензитета апсорпционих

трака у инфрацрвеној спектралној области можемо потврдити формирање инклузионог комплекса<sup>204</sup>.



Слика 4.71. FT-IR спектри слободног ацетилшиконина (**4**),  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (**4**/ $\beta$ -CD).

FT-IR спектар **4** карактерише широка трака валенционе вибрације О-Н везе на 3650-3250 cm<sup>-1</sup>, слабије интензивна =C-H трака на 3042 cm<sup>-1</sup> која припада нафтохинонском делу молекула, серија трака које припадају валенционим вибрацијама алкил група на 2971 cm<sup>-1</sup>, 2932 cm<sup>-1</sup>, 2912 cm<sup>-1</sup> и 2855 cm<sup>-1</sup>, интензивна естарска C=O трака на 1733 cm<sup>-1</sup>, траке које припадају C=C везама из нафтохинона на 1610 cm<sup>-1</sup>, 1603 cm<sup>-1</sup>, 1575 cm<sup>-1</sup> и 1455 cm<sup>-1</sup> и серија

трака валенционих С-О и С-О-С вибрација на  $1237\text{ cm}^{-1}$ ,  $1219\text{ cm}^{-1}$ ,  $1209\text{ cm}^{-1}$  и  $1115\text{ cm}^{-1}$ . У FT-IC спектру  $\beta$ -CD карактеристичне траке су интензивна и широка трака која се налази у опсегу  $3650\text{--}3140\text{ cm}^{-1}$ , а одговара О-Н валенционим вибрацијама, средње интензивне валенционе вибрације С-Н веза на  $2923\text{ cm}^{-1}$  и  $2894\text{ cm}^{-1}$ , траке деформационих вибрација Н-ОН веза на  $1647\text{ cm}^{-1}$ , као и серија интензивних трака на  $1157\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$ ,  $1032\text{ cm}^{-1}$  и  $1028\text{ cm}^{-1}$  које одговарају валенционим вибрацијама С-О и С-О-С веза. Добијени резултати су за FT-IC спектар  $\beta$ -CD у складу су са претходно објављеним резултатима<sup>205,206</sup>.

FT-IC спектар инклузионог комплекса **4**/ $\beta$ -CD окарактерисан је интензивном и широком траком у опсегу од  $3670\text{ cm}^{-1}$  -  $3150\text{ cm}^{-1}$  која одговара валенционим вибрацијама О-Н везе, преклопљеним тракама С-Н валенционих вибрација на  $2923\text{ cm}^{-1}$ , тракама које одговарају валенционим вибрацијама естарске С=О групе на  $1745\text{ cm}^{-1}$ , траком деформационе вибрације Н-ОН везе на  $1614\text{ cm}^{-1}$ , траком која одговара С=С вези из нафтохинонског дела молекула на  $1590\text{ cm}^{-1}$  и  $1572\text{ cm}^{-1}$ , као и серијом валенционих вибрација С-О и С-О-С веза на  $1230\text{ cm}^{-1}$ ,  $1201\text{ cm}^{-1}$ ,  $1157\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$ ,  $1035\text{ cm}^{-1}$  и  $1029\text{ cm}^{-1}$ .

Седам глюкопиранозних јединица молекула  $\beta$ -CD са својим бројним О-Н, С-Н, С-О и С-О-С функционалним групама за резултат даће јако интензивне траке у FT-IC спектру формираног инклузионог комплекса **4**/ $\beta$ -CD. Исто тако, одговарајуће валенционе вибрације О-Н и С-Н група молекула **4** преклају се са истим валенционим вибрацијама  $\beta$ -CD у спектру формираног инклузионог комплекса. Како су у оба молекула присутне и валенционе вибрације С-О и С-О-С група у спектру инклузионог комплекса и оне ће се преклапати. Изузетак у спектру инклузионог комплекса је уочен у случају трака нижег интенитета С-О група са ароматичног дела молекула ацетилшконина и С-О-С естарске групе које се појављују на нижим таласним бројевима ( $1230\text{ cm}^{-1}$  и  $1201\text{ cm}^{-1}$ ). Као последица промене микро-средине (окружења) нафтохинонског система, траке које потичу од валенционих вибрација С=С веза нафтохинона апсорбују на мањим таласним бројевима ( $1590\text{ cm}^{-1}$  и  $1572\text{ cm}^{-1}$ ) у спектру инклузионог комплекса, док се трака која одговара валенционој вибрацији естарске С=О групе **4**, у спектру инклузионог комплекса налази на већем таласном броју ( $1745\text{ cm}^{-1}$ ). Представљене промене у спектрима инклузионог комплекса потврђују да је дошло до уграђивања молекула **4** у молекул  $\beta$ -CD.

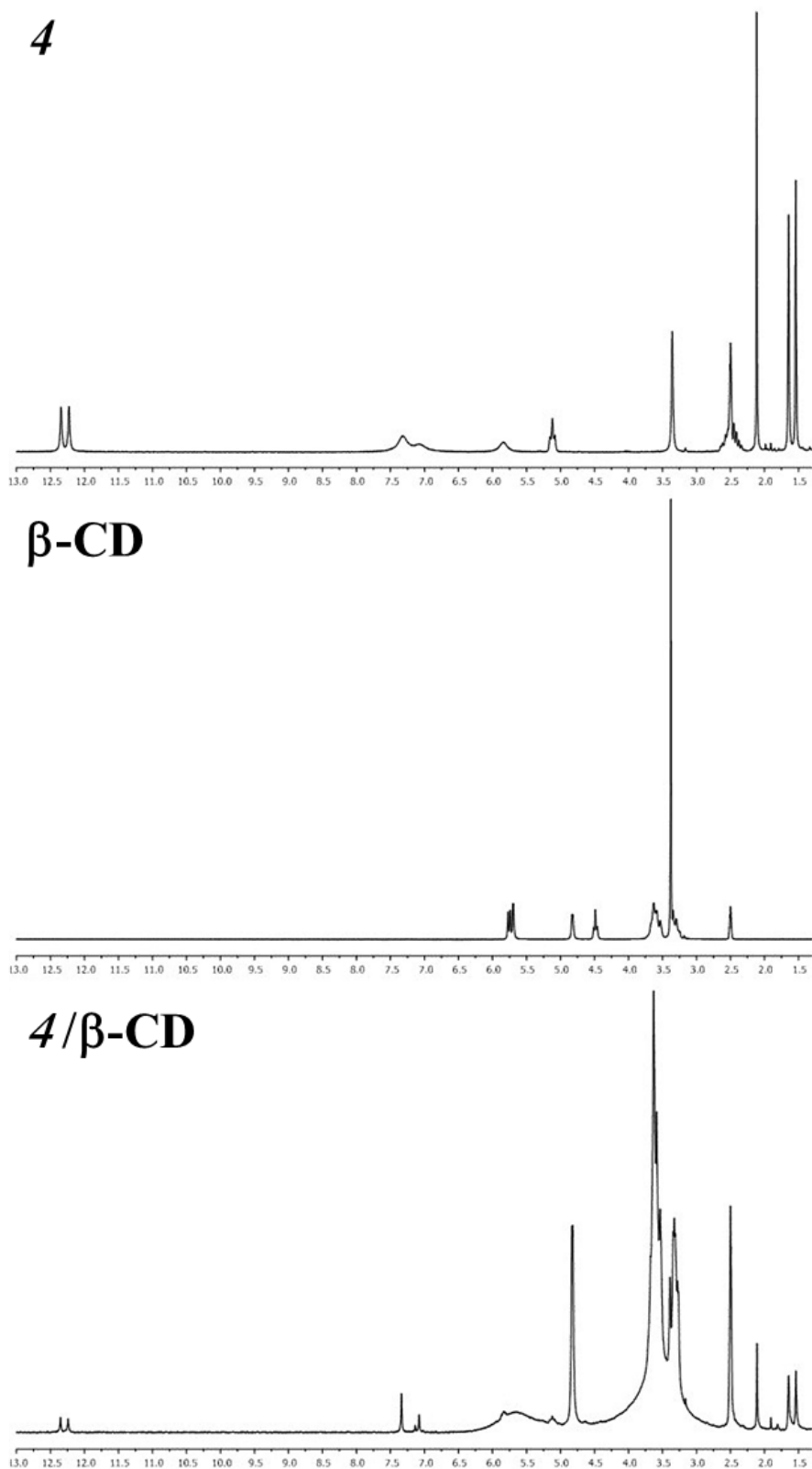
4.13.3.  $^1\text{H}$  NMR спектрална анализа

При формирању инклузионог комплекса  $4/\beta\text{-CD}$  долази до формирања нековалентних веза које узрокују промене у локалном окружењу протона из гост-молекула **4**, као и  $\text{C}_5\text{-H}$  и  $\text{C}_3\text{-H}$  протона лоцираних у шупљини молекула  $\beta\text{-CD}$  <sup>207</sup>. Поређење  $^1\text{H}$  NMR спектра гост (**4**) и домаћин ( $\beta\text{-CD}$ ) молекула са  $^1\text{H}$  NMR спектром њиховог инклузионог комплекса обезбедило је непосредне доказе о енкапсулирању ацетилшиконина (**4**).  $^1\text{H}$  NMR спектри слободног ацетилшиконина (**4**), слободног  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta\text{-CD}$ ) као и бинарног система ( $4/\beta\text{-CD}$ ) представљени су на *Слика 4.72.*, док су вредности хемијских померања одговарајућих протона представљене у *Табела 4.10.*

**Табела 4.10.** Хемијска померања ( $\delta/\text{ppm}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ) протона у спектрима слободног **4**, слободног  $\beta\text{-CD}$  и бинарног система  $4/\beta\text{-CD}$

Једињење	Протон	Слободни ( $\delta/\text{ppm}$ )	Инклузиони комплекс	$\Delta\delta$ (ppm)
			( $\delta/\text{ppm}$ )	
<b>4</b>	$\text{C}_{16}\text{-H}$	1,540	1,537	0,003
	$\text{C}_{15}\text{-H}$	1,645	1,644	0,001
	$\text{C}_2\text{-H}$	2,119	2,110	0,009
	$\text{C}_{12}\text{-Ha}$	2,412	2,415	-0,003
	$\text{C}_{12}\text{-Hb}$	2,570	2,568	0,002
	$\text{C}_{13}\text{-H}$	5,119	5,122	-0,003
	$\text{C}_{11}\text{-H}$	5,834	5,835	-0,001
	$\text{C}_3\text{-H}$	7,075	7,080	-0,005
	$\text{C}_6\text{-H}$ и $\text{C}_7\text{-H}$	7,318	7,338	-0,020
	$\text{C}_5\text{-OH}$	12,229	12,242	-0,013
	$\text{C}_8\text{-OH}$	12,344	12,353	-0,009
$\beta\text{-CD}$	$\text{C}_5\text{-H}$	3,579	3,616	-0,037
	$\text{C}_3\text{-H}$	3,631	3,669	-0,038

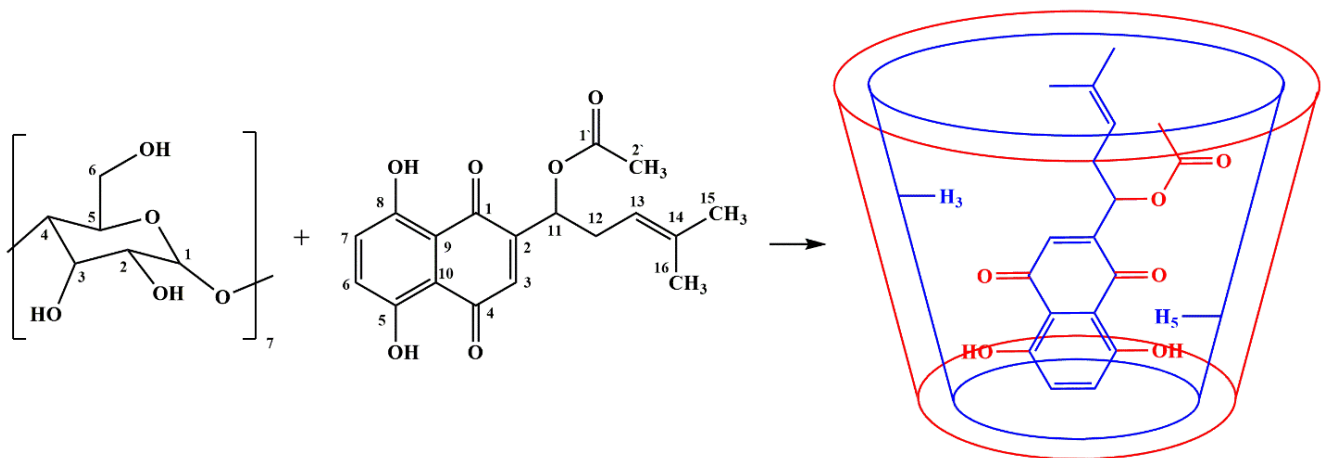




Слика 4.72.  $^1\text{H}$  NMR спектри слободног ацетишликонина (**4**),  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетишликонин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (**4**/ $\beta$ -CD).

На основу представљених резултата може се приметити да су након формирања инклузионог комплекса сигнали протона  $C_{16}$ -H,  $C_{15}$ -H,  $C_2$ -H и  $C_{12}$ -H<sub>b</sub> из молекула **4** благо померени ка нижим вредностима хемијског померања ( $\Delta\delta = 0,003$  ppm,  $0,001$  ppm,  $0,009$  ppm и  $0,002$  ppm), док су протони  $C_{12}$ -H<sub>a</sub>,  $C_{13}$ -H,  $C_{11}$ -H и  $C_3$ -H истог молекула благо померени ка нижем пољу ( $\Delta\delta = -0,003$  ppm,  $-0,003$  ppm,  $-0,001$  ppm и  $-0,005$  ppm). Са друге стране, протони  $C_6$ -H и  $C_7$ -H из нафтохинонског дела молекула **4** у спектру инклузионог комплекса су померени на нешто вишу вредност хемијског померања ( $\Delta\delta = -0,020$  ppm), а значајне промене у хемијском померању запажене су и код протона хидроксилних група нафтохинонског дела молекула **4**.

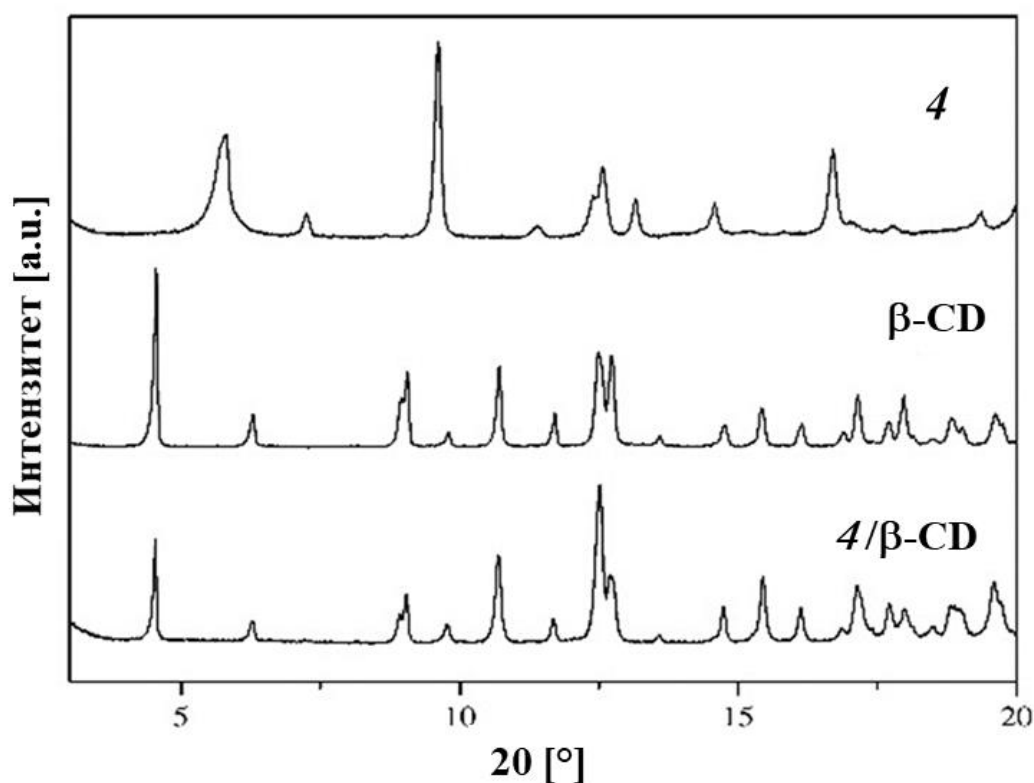
Сумирањем резултата може се јасно закључити да молекул **4** улази у шупљину  $\beta$ -CD са нафтохинонске стране молекула, што потврђује и велико померање сигнала који потичу од протона  $C_5$ -H и  $C_3$ -H ка нижим пољима ( $\Delta\delta = -0,037$  ppm и  $-0,038$  ppm, редом) лоцираних у шупљини  $\beta$ -CD. Оваква оријентација нафтохинонског дела молекула **4** унутар шупљине  $\beta$ -CD мења електронску густину око  $C_5$ -H и  $C_3$ -H протона, што индукује промене у константи заштите за поменуте протоне, а самим тим и њихово померање ка већим вредностима хемијског померања. Претпостављени начин инклузије молекула **4** унутар шупљине  $\beta$ -CD представљен је на *Слика 4.73.*



*Слика 4.73.* Претпостављени начин инклузије ацетилишиконина (**4**) у шупљину  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD)

## 4.13.4. XRPD структурна анализа

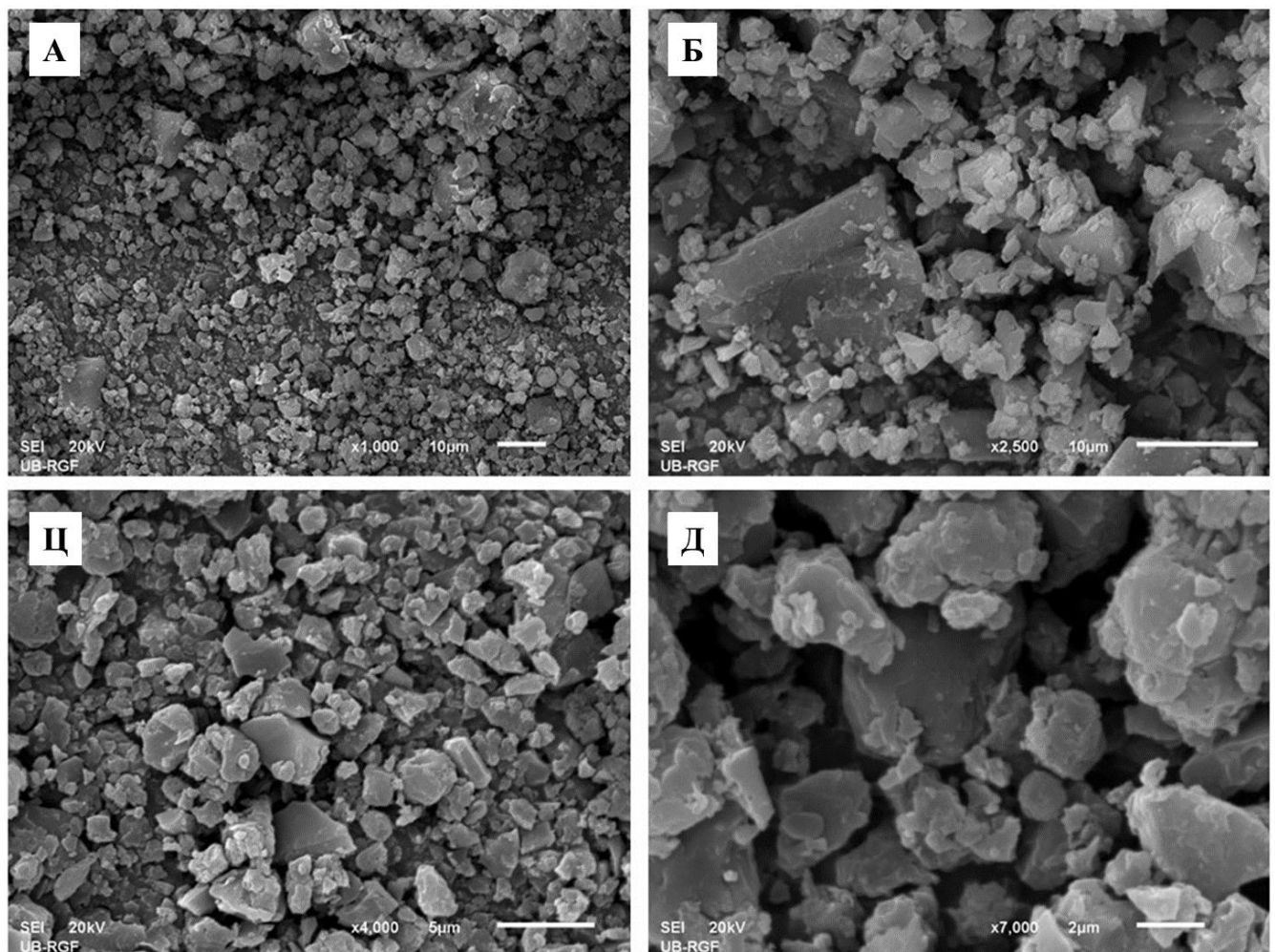
XRPD анализу смо користили за потврду добијеног инклузионог комплекса. На Слика 4.74. представљени су дифрактограми слободног ацетилшиконина (**4**),  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (**4**/ $\beta$ -CD). Интерпретацијом представљених дифрактограма примећује се недостатак дифракционих линија у инклузионом комплексу **4**/ $\beta$ -CD карактеристичних за слободан ацетилшиконин (**4**), што би била карактеристика чисте физичке смеше **4** и  $\beta$ -CD. Осим тога, у дифрактограму инклузионог комплекса се јављају и дифракционе линије различитог интензитета, као и додатне линије слабог интензитета, у поређењу са дифрактограмом чистог  $\beta$ -CD. Из наведеног можемо закључити да је инклузиони комплекс формиран.



Слика 4.74. Карактеристике XRPD спектра ацетилшиконина (**4**),  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -CD) и ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин инклузионог комплекса (**4**/ $\beta$ -CD).

#### 4.13.5. SEM карактеризација

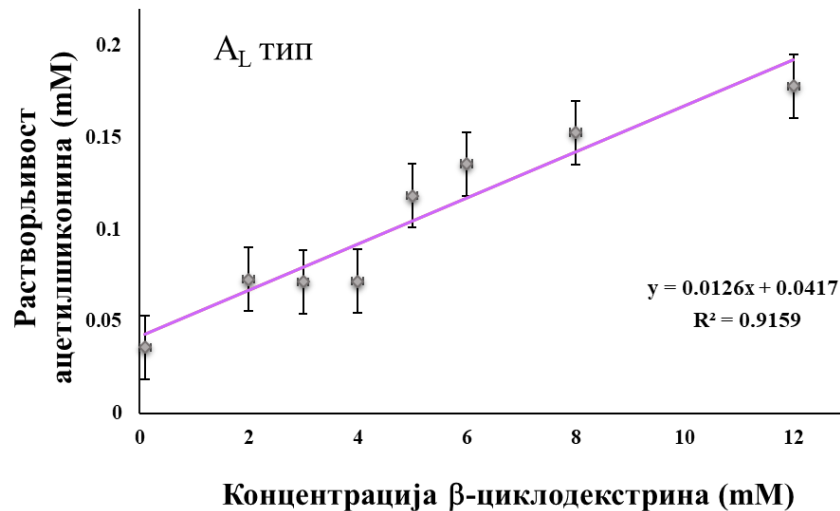
Слике добијене скенирајућим електронским микроскопом (SEM) приказане су на Слика 4.75.. На основу слабо увећаних слика (А) најпре се могу приметити веће агломерирани масе, док се при већим увећањима (Ц и Д) јасно уочава да су појединачне честице величине неколико стотина nm. Хомогеност супстанце подржава закључак из резултата добијених применом XRPD анализе, да је формиран инклузиони комплекс 4/ $\beta$ -CD.



Слика 4.75. SEM слике инклузионог комплекса (4/ $\beta$ -CD) увећане 1000 (А), 2500 (Б), 5000 (Ц) и 7500 (Д) пута

#### 4.13.6. Тест фазне растворљивости

У циљу одређивања стехиометријског односа компонената у формираном инклузионом комплексу **4**/ $\beta$ -CD користили смо тест фазне растворљивости. На *Слика 4.76.* се може видети да се растворљивост **4** линеарно повећава са повећањем концентрације  $\beta$ -CD, што у складу са литературним подацима који указују да је формиран инклузиони систем  $A_L$ -типа <sup>208</sup>.



*Слика 4.76.* Дијаграм фазне растворљивости ацетилишконина (**4**) са  $\beta$ -циклодекстрином у дестилованој води на 25 °C. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  SD од три различита експеримента.

Са *Слика 4.76.* се такође може видети да је нагиб праве мањи од јединице, што указује на то да је однос субстрат/лиганд 1:1 М/М, заправо да енкапсулација води формирању бинарног система гост/домаћин. Такође, израчуната константа стабилности ( $K_s$ ) од  $306,01 \text{ M}^{-1}$  показује: да је формиран бинарни инклузиони систем између **4** и  $\beta$ -CD прилично стабилан; ослобађање нафтохинона из рупе молекула домаћина ( $\beta$ -CD) је успорено; да је енкапсулирани нафтохинон заштићен од спољашњих фактора који могу условити његову деградацију (светлост, топлота, кисеоник из ваздуха); да је увећана биорасположивост липофилног секундарног метаболита увећањем растворљивости у води, а као последица присуства хидрофилног спољашњег слоја  $\beta$ -CD <sup>209</sup>.

#### 4.14. Цитотоксична активност инклузионог комплекса ацетилшиконин/ $\beta$ -циклодекстрин ( $4/\beta$ -CD)

##### 4.14.1. МТТ тест

Цитотоксични ефекат инклузионог комплекса  $4/\beta$ -CD испитиван је на хуманој ћелијској линији канцера дебелог црева (HCT-116) и хуманој ћелијској линији аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) у третманима од 24 h, 48 h и 72 h. Ради поређења цитотоксичног ефекта инклузионог система  $4/\beta$ -CD са ацетилшиконином и  $\beta$ -циклодекстрином под истим условима и на истим ћелијама одређена је и цитотоксичност слободних ацетилшиконина и  $\beta$ -циклодекстрина. Тестиране ћелијске линије третиране су различитим концентрацијама (1, 3, 10, 30 и 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) инклузионог комплекса  $4/\beta$ -CD, слободног ацетилшиконина (**4**) и  $\beta$ -циклодекстрина употребом МТТ теста. У Табела 4.11. представљени су резултати као  $\text{IC}_{50}$  вредности ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), док су на Слика 4.77. представљене дозно-зависне криве ефеката инклузионог комплекса  $4/\beta$ -CD, слободног ацетилшиконина и  $\beta$ -циклодекстрина 24 h, 48 h и 72 h након третмана.

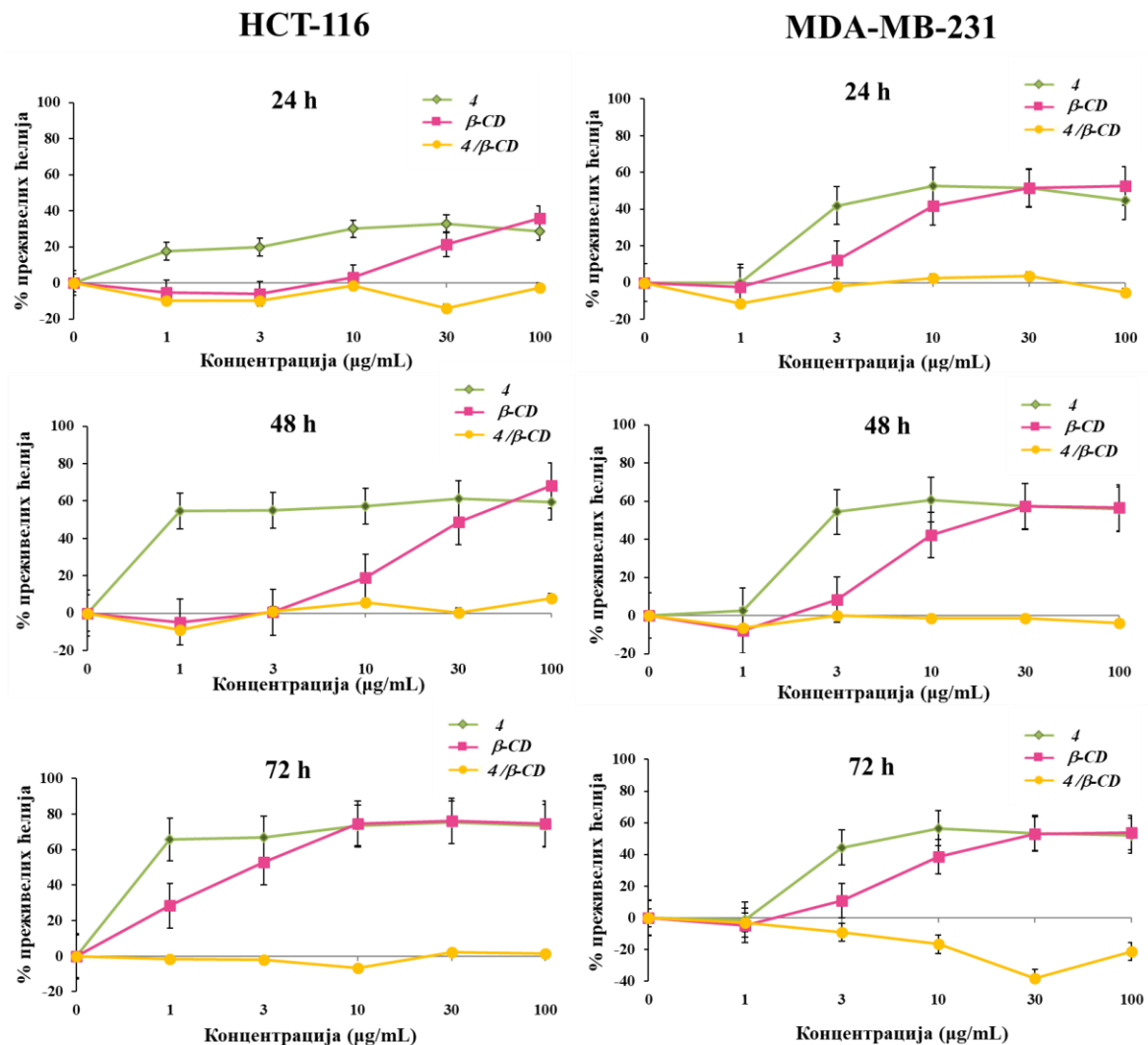
**Табела 4.11.**  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) вредности слободног ацетилшиконина (**4**) и инклузионог комплекса ( $4/\beta$ -CD) на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама након третмана од 24 h, 48 h и 72 h, одређене МТТ тестом.

Ћелијске линије и тестирана једињења	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					
	HCT-116			MDA-MB 231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>4</b>	47,9 $\pm$ 5,9	15,9 $\pm$ 1,2	7,8 $\pm$ 0,9	23,5 $\pm$ 2,9	19,7 $\pm$ 7,8	21,6 $\pm$ 0,8
$4/\beta$ -CD	40,9 $\pm$ 29,4	11,2 $\pm$ 1,7	1,2 $\pm$ 2,7	35,5 $\pm$ 1,8	32,5 $\pm$ 10,5	34,5 $\pm$ 5,0

<sup>1</sup> $\text{IC}_{50}$  вредности (дате као средње вредности  $\pm$  SD) су добијене из три независна мерења у трипликату

Приказани резултати јасно указују да инклузиони комплекс  $4/\beta$ -CD има значајан дозно зависни ефекат на вијабилност обе тестиране ћелијске линије. Временски завистан ефекат инклузионог комплекса  $4/\beta$ -CD на вијабилност ћелија примећен је код HCT-116 ћелија са  $\text{IC}_{50}$  вредностима од 40,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  након третмана од 24 h, 11,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  након третмана од 48 h и 1,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  након третмана од 72 h. У поређењу са слободним ацетилшиконином

који је након третмана од 72 h за резултат IC<sub>50</sub> вредности дао 7,8 µg/mL, може се закључити да је цитотоксичност ацетилшиконина у дужим третанима значајно повећана формирањем инклузионог комплекса. Цитотоксични ефекат инклузионог комплекса 4/β-CD на MDA-MB-231 ћелијској линији значајно је мањи у поређењу са НСТ-116 ћелијском линијом у свим тестираним временима (Табела 4.11.). Битно је напоменути да је на основу добијених резултата примећено да слободан β-CD не показује цитотоксичан ефекат ни на једној од тестираних ћелијских линија.



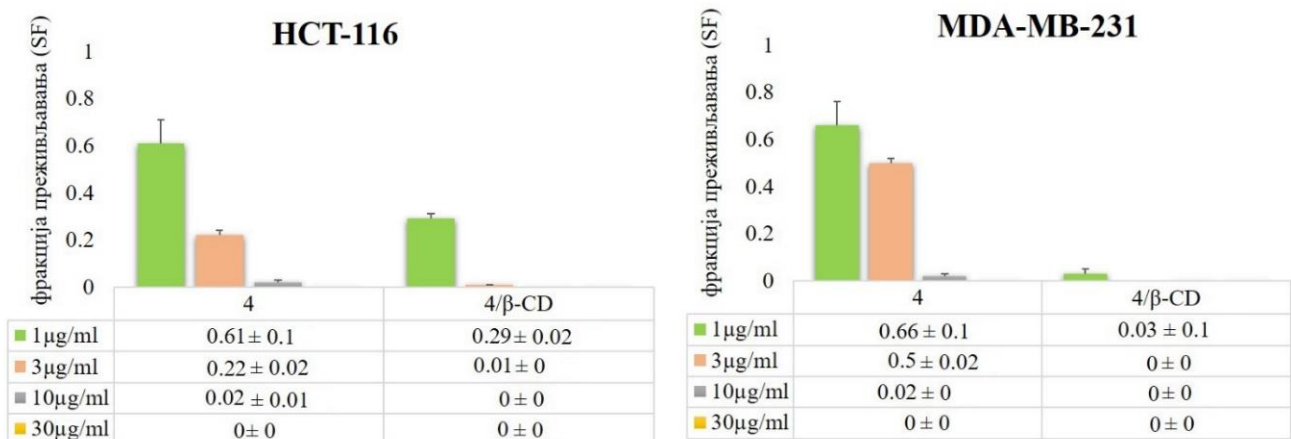
Слика 4.77. Дозно зависне криве цитотоксичног ефекта различитих концентрација 4, 4/β-CD и β-CD на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама након третмана од 24 h, 48 h и 72 h, одређене МТТ тестом. Добијени резултати представљени су као средња вредност од три независна мерења ± SD.

Сумирањем представљених резултата долазимо до закључка да инклузиони комплекс  $4/\beta$ -CD ефективно инхибира раст НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијских линија након краткотрајног третмана од 24 h. Такође, испитивани бинарни систем показао је значајно већу цитотоксичну активност на НСТ-116 ћелијској линији у поређењу са слободним ацетилшиконином (**4**) и слободним  $\beta$ -CD.

#### 4.14.2. Клоногени тест

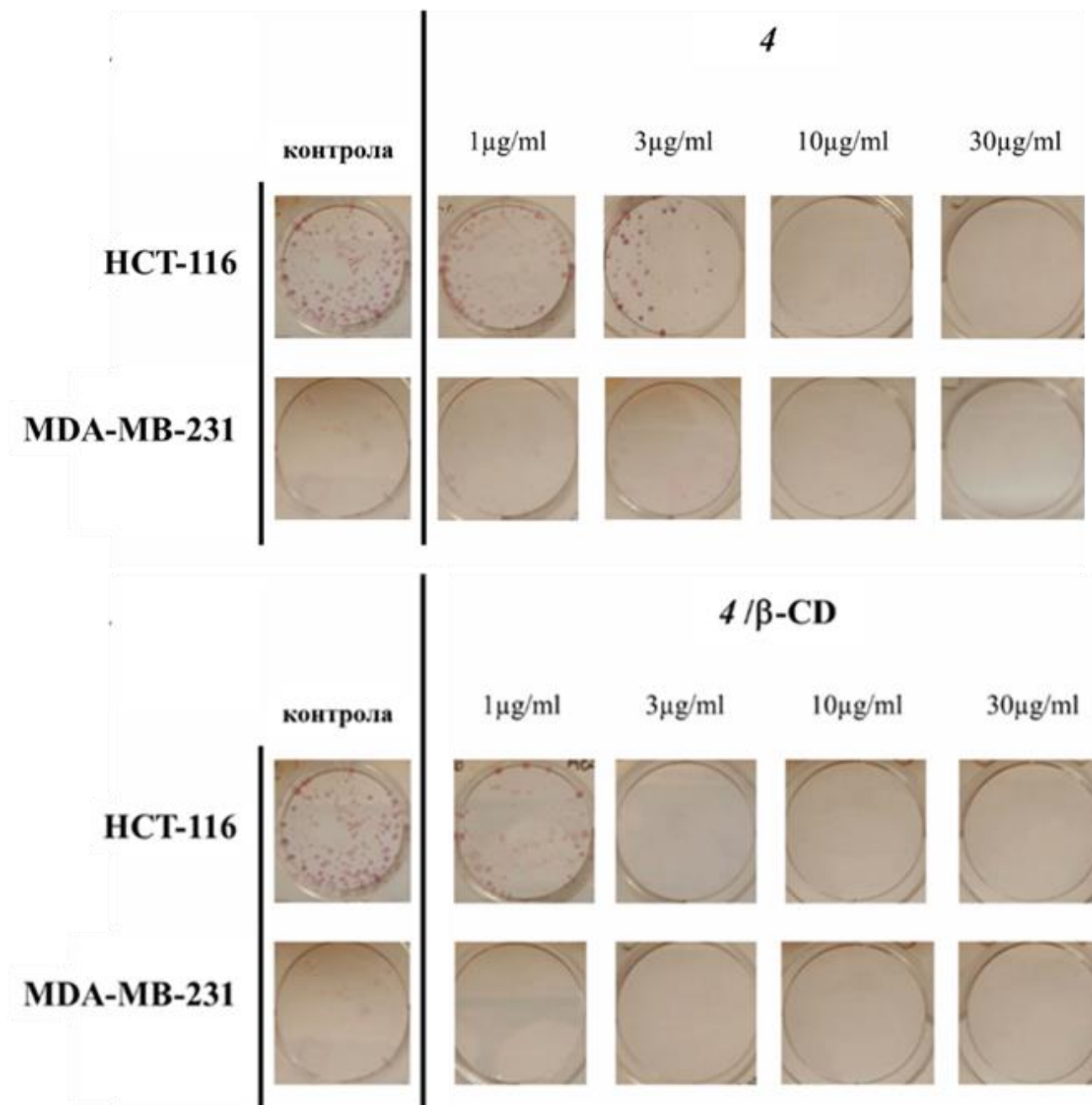
Како смо на основу краткотрајног МТТ теста показали цитотоксични ефекат  $4/\beta$ -CD према НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама, следећи корак је био испитати и упоредити дуготрајни цитотоксични ефекат различитих концентрација **4** и  $4/\beta$ -CD на истим туморским ћелијским линијама применом клоногеног теста. Добијени резултати представљени су на *Слика 4.78.* и *Слика 4.79.*

Представљени резултати показују да и слободан **4** и инклузиони комплекс  $4/\beta$ -CD знатно, дозно зависно, смањују фракцију преживљавања (SF) испитиваних ћелија. Међутим, ефекат инклузионог комплекса при најнижој концентрацији третмана (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) је два пута већи код НСТ-116 ћелија, а чак 20 пута већи код МДА-МВ-231 ћелија, у односу на ефекат нафтохинона **4**.



**Слика 4.78.** Клоногено преживљавање НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија третираних различитим концентрацијама ацетилшиконина (**4**) и инклузионог комплекса ( $4/\beta$ -CD). Графици фактора преживљавања НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелија третираних једињењем **4** и инклузионим комплексом  $4/\beta$ -CD. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SD из три независна експеримента.



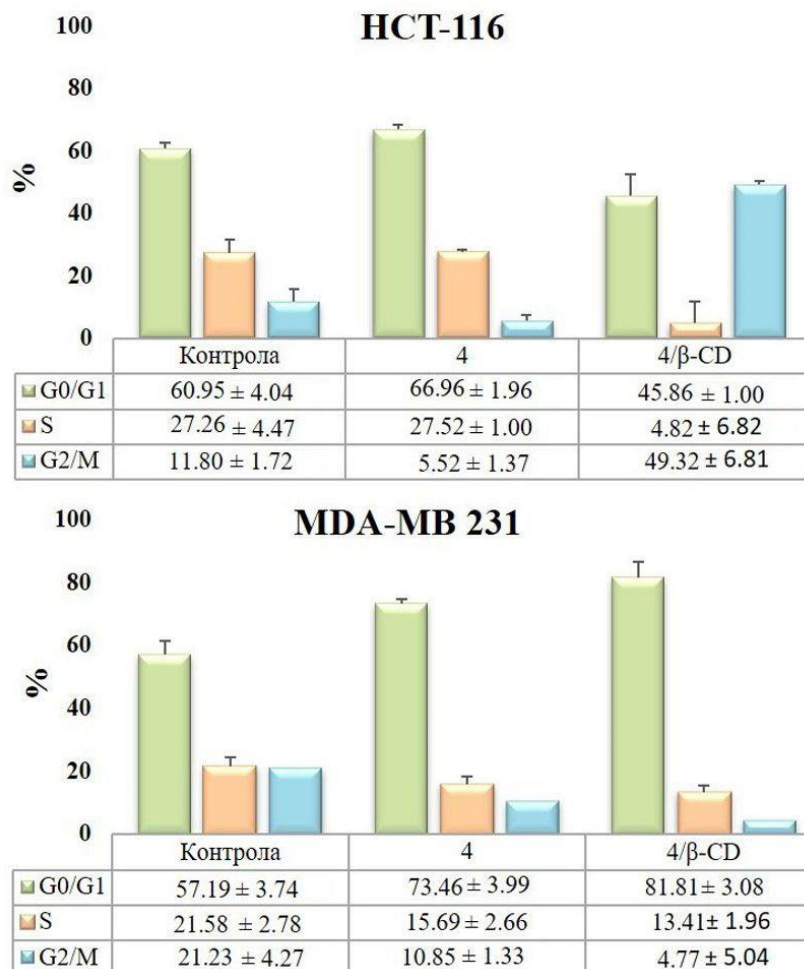


Слика 4.79. Клоногено преживљавање HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија третираних различитим концентрацијама ацетишконина (4) и инклузионог комплекса (4/β-CD). Слике клоногеног теста.

На основу ових резултата можемо закључити да инклузиони комплекс показује много јачу могућност инхибиције клоногеног преживљавања на обе ћелијске линије.

#### 4.15. Ефекат инклузионог комплекса (4/ $\beta$ -CD) на поделу ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијских линија

У циљу добијања додатних информација о цитотоксичној активности инклузионог комплекса, испитиван је ефекат **4** и **4/ $\beta$ -CD** на поделу ћелијског циклуса код хумане ћелијске линије канцера дебелог црева (НСТ-116) и хумане ћелијске линије аденокарцинома дојке (MDA-MB-231), након третмана од 48 h. Тестиране ћелијске линије инкубиране су нафтохиноном **4** и инклузионим комплексом **4/ $\beta$ -CD** у концентрацијама које одговарају IC<sub>50</sub> вредностима или само медијумом (контрола), а резултати су представљени на *Слика 4.80.*



*Слика 4.80. Ефекат једињења **4** и инклузионог комплекса **4/ $\beta$ -CD** на дистрибуцију ћелијског циклуса НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија. Дијаграми представљају проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. Резултати су представљени као средње вредности ± SD добијене из три независна мерења.*

Резултати представљени на *Слика 4.80.* указују на то да третман инклузионим комплексом  $4/\beta$ -CD код НСТ-116 ћелија доводи до застоја у G2/M (49,3 % ћелија) фази ћелијског циклуса, а код MDA-MB-231 ћелија доводи до застоја у G0/G1 (81,8 % ћелија) фази. Третман слободним ацетилшиконином (**4**) код НСТ-116 ћелија није показао значајне измене у ћелијском циклусу у поређењу са контролом, док је код MDA-MB-231 ћелија овим третманом ћелијски циклус заустављен у G0/G1 фази (73,5 %).

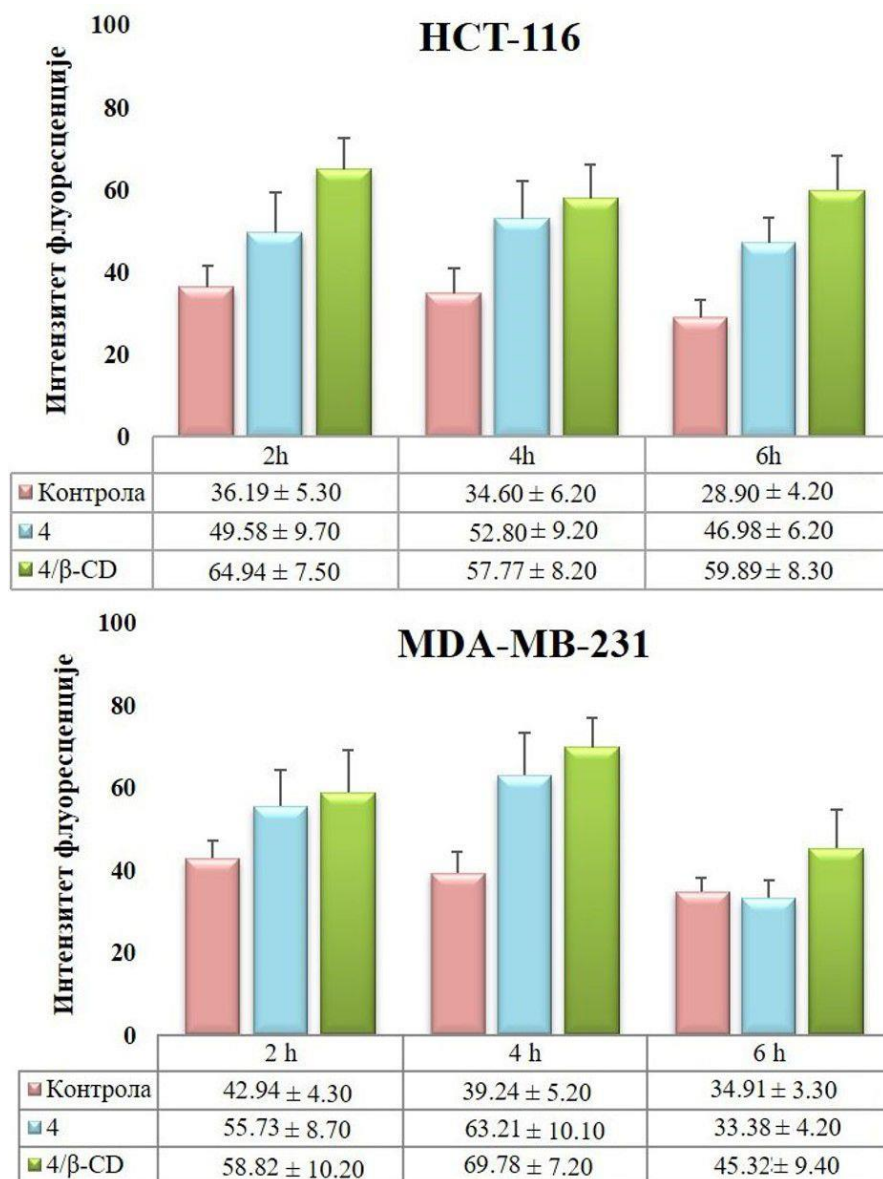
На основу презентованих резултата можемо закључити да третман инклузионим комплексом у обе тестиране ћелијске линије индукује јачи застој у ћелијском циклусу у поређењу са третманом слободним ацетилшиконином (**4**).

#### **4.16. Ефекат инклузионог комплекса ( $4/\beta$ -CD) и слободног ацетилшиконина (**4**) на укупан садржај реактивних кисеоничних врста**

Како би даље разумели механизам приказаног цитотоксичног ефекта инклузионог комплекса иситиван је његов ефекат на продукцију интрацелуларних ROS у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама и упоређен са ефектом слободног ацетилшиконина. Тестиране ћелије третиране су претходно добијеним IC<sub>50</sub> вредностим (на основу МТТ теста) нафтохиноном **4**, инклузионим комплексом  $4/\beta$ -CD и само медијумом (контрола) у временском интервалу од 2 h, 4 h и 6 h. Добијени резултати представљени су на *Слика 4.81.*

На основу представљених резултата може се закључити да инклузиони комплекс повећава продукцију ROS у обе ћелијске линије и то у односу на контролу 2 пута више у НСТ-116 и 1,5 пута више у MDA-MB-231 ћелијској линији. У поређењу са третманом слободним ацетилшиконином (**4**) повећање у продукцији ROS у третману са инклузионим комплексом је 1,3 пута веће код НСТ-116 ћелија и 1,1 пута веће код MDA-MB-231 ћелија.

Прекомерна продукција интрацелуларних ROS не мора бити резултат само абнормалног метаболизма, већ може бити изазвана терапијама различитим лековима. Оксидативни стрес је јако укључен у цитотоксични ефекат изазван лековима, и у том погледу се може посматрати могућа употреба енкапсулираног ацетилшиконина у терапији тумора <sup>210</sup>.

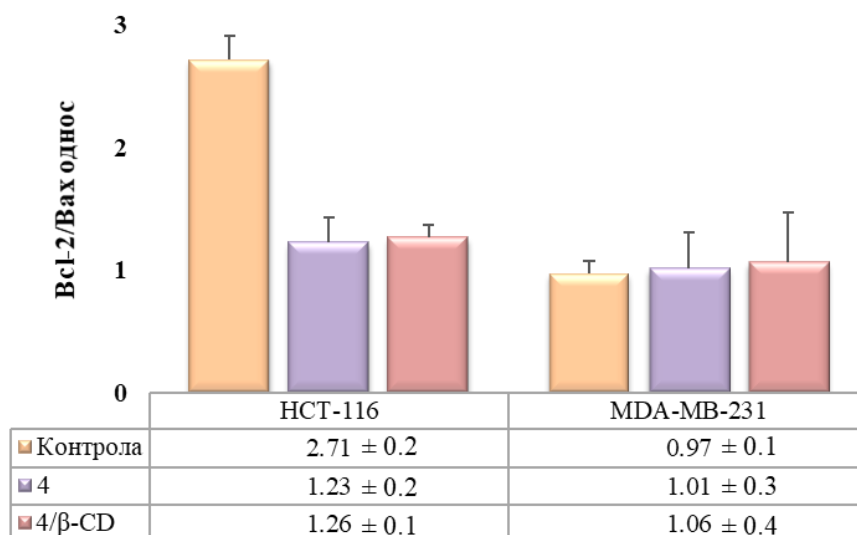


**Слика 4.81.** Ефекат слободног ацетилицонина (4) и инклузионог комплекса 4/β-CD на продукцију реактивних кисеоничних врста у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Резултати су представљени као средње вредности ± SD добијене из три независна мерења.

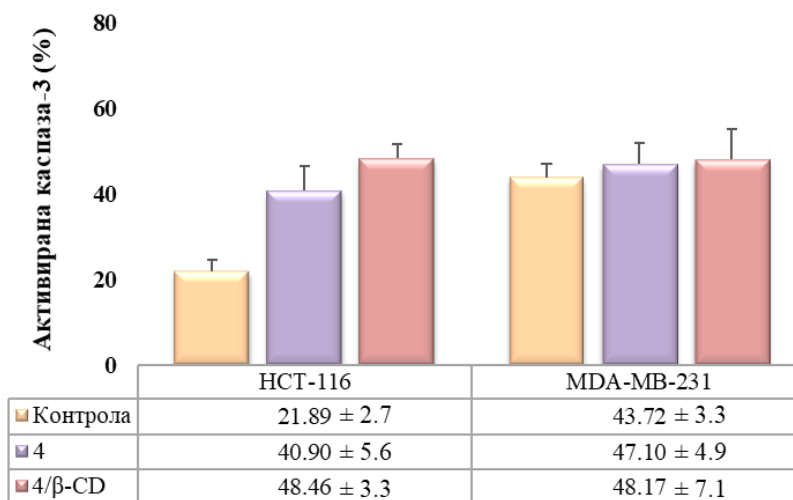
#### 4.17. Ефекат инклузионог комплекса 4/β-CD на протеине апоптозе

На основу већ представљених резултата који јасно сугеришу на јак антитуморски ефекат инклузионог комплекса 4/β-CD према HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама канцера, одлучили смо да испитамо и његов апоптотски ефекат анализом експресије кључних апоптотских протеина Bcl-2, Вах и активне каспазе-3, и упоредимо га са

апоптотским ефектом у ћелијама третираним слободним ацетиљшиконином (**4**)<sup>211</sup>. Резултати ове анализе представљени су на *Слика 4.82.* и *Слика 4.83.*



**Слика 4.82.** Експресија регулаторних протеина апоптозе у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама третираним  $IC_{50}$  вредностима слободног ацетиљшиконина (**4**) и инклузионог комплекса **4/β-CD** у временском интервалу од 48 h. Однос нивоа Bcl-2/Bax протеина у третираним и контролним ћелијама. Резултати су представљени као средње вредности ± SD од три независна експеримента.



**Слика 4.83.** Експресија регулаторних протеина апоптозе у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама третираним  $IC_{50}$  вредностима слободног ацетиљшиконина (**4**) и инклузионог комплекса **4/β-CD** у временском интервалу од 48 h. Процент третираних и нетретираних ћелија које експримирају активну каспазу-3. Резултати су представљени као средње вредности ± SD од три независна експеримента.

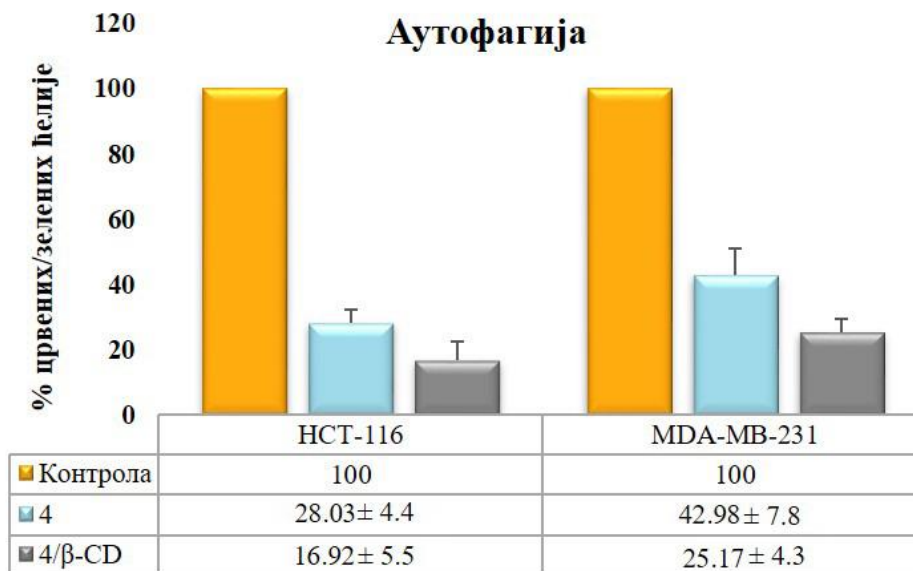
Представљени резултати показују да је у третману НСТ-116 ћелија  $IC_{50}$  вредностима како инклузионим комплексом  $4/\beta$ -CD, тако и нафтохиноном **4** у временском интервалу од 48 h долази до значајног повећања експресије про-апоптотског протеина Вах, док експресија анти-апоптотског протеина Bcl-2 опада. Као последица ових резултата смањује се однос Bcl-2/Вах у поређењу са контролним ћелијама.

Осим тога, оба третмана утичу на повећање процента ћелија код којих долази до експресије активне каспазе-3 у НСТ-116 ћелијама у поређењу са контролом. У поређењу са третманом ацетилшикониним (**4**), инклузиони комплекс  $4/\beta$ -CD индукује 1,2 пута јачу експресију активне каспазе-3.

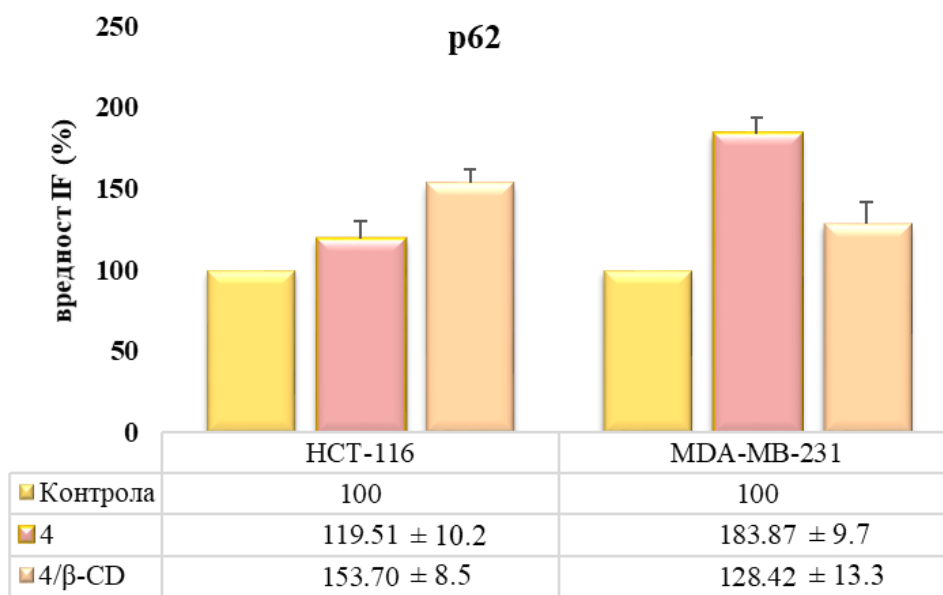
Третман MDA-MB-231 ћелија инклузионим комплексом  $4/\beta$ -CD и нафтохиноном **4** није показао значајан ефекат на експресију протеина Bcl-2, Вах и активне каспазе-3, па можемо закључити да се у овом случају ћелијска смрт одвија неким другим путевима.

#### **4.18. Ефекат инклузионог комплекса $4/\beta$ -CD на инхибицију аутофагије**

Аутофагија има улогу тумор супресора, као и вида механизма који обезбеђује преживљавање туморским ћелијама и често је нерегулисана у третману канцера<sup>212</sup>. Из тог разлога, инхибиција аутофагије може бити корисна у третману канцера<sup>213</sup>. Аутофагију карактерише формирање кисело-везикуларних органела (AVOs) које могу бити детектоване и измерене бојењем са акридин-оранж (АО) флуоресцентном бојом која има могућност лаког проласка кроз биолошке мембране. Када се АО акумулира у поменутиим киселим компонентама, емитује јаку црвену флуоресценцију па се применом проточне цитометрије овим тестом може детектовати аутофагија и квантификовати акумулација AVOs. Туморске НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије обојене АО третиране су  $IC_{50}$  вредностима инклузионог комплекса  $4/\beta$ -CD и ацетилшиконина **4** у временском интервалу од 48 h и упоређене са контролом (нетретираним ћелијама). На *Слика 4.84.* и *Слика 4.85.* представљени су резултати овог експеримента.



**Слика 4.84.** Ефекти ацетилшиконина (4) и инклузионог комплекса (4/β-CD) на инхибицију аутофагије у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама. Процент црвених/зелених ћелија у третираним HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама у поређењу са контролом. Резултати су представљени као средње вредности ± SD од три независна експеримента.



**Слика 4.85.** Експресија p62 протеина у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама третираним слободним ацетилшикониним (4) и инклузионим комплексом 4/β-CD у поређењу са контролом. Резултати су представљени као средње вредности ± SD од три независна експеримента.

Оба третмана, слободним ацетилшикониним (4) као и инклузионим комплексом 4/β-CD довела су до инхибиције аутофагије са тим да је третман инклузионим комплексом био значајно ефикаснији у обе ћелијске линије. У HCT-116 ћелијској линији проценат

црвених/зелених ћелија при третману инклузионим комплексом износио је 16,9 %, док је у третману ацетилшикониним исти проценат износио 28,0 %, а у MDA-MB-231 ћелијској линији третман инклузионим комплексом износио је 25,2 %, док је третман ацетилшикониним износио 42,9 % (Слика 4.84.).

Повећање експресије рб2 протеина, који је маркер аутофагије, потврђује инхибицију аутофагије у обе ћелијске линије (Слика 4.85.).





## *5. Закључак*

У оквиру ове докторске дисертације одређен је садржај индивидуалних компоненти нафтохинонских деривата у различитим екстрактима корена биљке *Onosma visianii* Clem. Изоловано је седам нафтохинонских деривата из групе шиконина, и добијен је бинарни систем енкапсулацијом изолованог нафтохинона ацетилшиконина у молекул  $\beta$ -циклодекстрина. Такође, у циљу утврђивања фармаколошког значаја екстракта, изолованих једињења и бинарног система испитана ја и њихова биолошка активност. На основу резултата добијених применом различитих метода могу се извести следећи закључци:

- ✓ У циљу бржег и ефикаснијег изоловања нафтохинонских деривата из групе шиконина модификована је метода за изоловање. Модификовани поступак изоловања састојао се у прелиминарном фракционисању екстракта добијеног применом растварачке смеше петрол етар:метилен хлорид (1:1 v/v) употребом препаративне танкослојне хроматографије. Добијен је мањи број фракција (осам), које су затим подвргнуте хроматографији на колони у циљу њиховог пречишћавања. Издвајање на колони је праћено аналитичком танкослојном хроматографијом, а додатно пречишћавање извршено је применом семипрепаративне HPLC. Овом методом изоловано је седам деривата шиконина и то деоксишиконин, изобутирилшиконин,  $\alpha$ -метилбутирилшиконин, ацетилшиконин,  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин, 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин и 5,8-*O*-диметил деоксишиконин. Неопходно је нагласити да је 5,8-*O*-диметил изобутирилшиконин у оквиру ове дисертације први пут идентификован у природном извору. Структурна карактеризација изолованих нафтохинона извршена је применом UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопских техника, као и употребом масене спектрометрије високе резолуције.
- ✓ Корен биљке *Onosma visianii* представља богат извор нафтохинонских деривата из групе шиконина и може се у те сврхе употребљавати уместо других биљака из породице *Boraginaceae*. Такође, екстракти хлороформа, ацетона и етил ацетата представљају боље раствараче за прелиминарну екстракцију биоактивних деривата изобутирилшиконина,  $\alpha$ -метилбутирилшиконина и ацетилшиконина, док је за екстракцију 5,8-*O*-диметил деривата пожељнија употреба растварача ацетона или хлороформа.

- ✓ У циљу испитивања цитотоксичне активности екстраката (ацетонског, хлороформског, етил ацетатног, метанолног и петрол етарског) на хуманој ћелијској линији канцера дебелог црева (HCT-116) и хуманој ћелијској линији аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) најпре је примењен МТТ тест. Добијене IC<sub>50</sub> вредности указале су на генерално већу осетљивост MDA-MB-231 ћелијске линије од HCT-116 на деловање тестираних екстраката. Такође уочена је значајно боља активност екстраката ацетона, хлороформа и етил ацетата према тестираним ћелијама канцера, па је испитана њихова могућност идукције апоптозе као и ефекат на заустављање ћелијског циклуса применом проточне цитометрије у тестираним ћелијама канцера. Анализа резултата је показала да тестирани екстракти на обе ћелијске линије индукују апоптозу са мањим процентом некротичних ћелија, као и да ацетонски и хлороформски екстракт доводе до застоја у митози заустављајући ћелијски циклус у G2/M фази, док етил ацетатни екстракт прекида синтезу ДНК заустављајући ћелијски циклус у S фази. Такође, може се закључити да је цитотоксични ефекат екстраката у директној корелацији са количином индивидуалних компоненти нафтохинонских пигмената, али се не сме занемарити ни синергистички ефекат присутних нафтохинона.
- ✓ Како би утврдили терапеутски потенцијал изолованих једињења испитан је њихов цитотоксични ефекат употребом МТТ теста на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама канцера. Резултати МТТ теста су показали да сва тестирана једињења временски и дозно зависно смањују вијабилност ћелија обе ћелијске линије, као и да је HCT-116 ћелијска линија показала већу осетљивост на третман изолованим једињењима. Проточном цитометријом одређен је тип ћелијске смрти изазван третманом изолованим једињењима, а резултати су показали да је апоптоза примарни начин смрти тестираних ћелија (HCT-116 и MDA-MB-231) уз мали проценат некротичних ћелија. Анализа резултата заустављања ћелијског циклуса указује на то да изоловани нафтохинони заустављају митозу и ћелијски циклус у G0/G1, S или G2/M фазама, што за резултат даје апоптозу у циљаним ћелијама.
- ✓ Како су  $\alpha$ -метилбутирилшиконин, ацетилшиконин и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконин показали најјачи цитотоксични ефекат на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама, испитан је њихов ефекат на маркере оксидативног стреса као потенцијалних механизма проапоптотских и антипролиферативних својстава. Резултати су показали да је третман

овим једињењима изазвао поремећај оксидативне хомеостазе ћелија рака дебелог црева и дојке, повећавајући ниво супероксид анјон радикала, нитрита, оксидованог и редукованог глутатиона.

- ✓ Испитивање интеракција  $\alpha$ -метилбутирилшиконина, ацетилшиконина и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина са молекулом ДНК применом UV-Vis и FL спектроскопских техника као и молекулске докинг симулације јасно указују да се тестирана једињења везују у области малог жлеба, богатој аденином и тиминим, преко конвенционалних водоничних и  $\pi$ -алкил веза, између ланаца молекула ДНК. Израчунате вредности Стерн-Волмерове константе гашења ( $K_{SV}$ ) реда величине  $10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$  указују на прилично исту могућност везивања сва три нафтохинона за молекул ДНК.
- ✓ Резултати интеракција  $\alpha$ -метилбутирилшиконина, ацетилшиконина и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина са молекулом хуманог серум албумина (HSA) добијени применом UV-Vis и FL спектроскопских техника као и молекулске докинг симулације указала су на њихову могућност да се чврсто вежу за HSA, и сасвим безбедно транспортују до циљних ћелија. Такође, битно је напоменути да ацетилшиконин формира стабилнији комплекс са молекулом протеина од  $\alpha$ -метилбутирилшиконина и  $\beta$ -хидроксиизовалерилшиконина.
- ✓ Антибактеријска активност свих седам изолованих шиконинских деривата испитана је применом микродилуционе технике на панелу мултирезистентних бактерија, и то пет грам позитивних (*Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium arborescens*, *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus epidermidis*) и пет грам негативних бактерија (*Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas roteolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Yersinia intermedia*). Тестирана једињења су показала добру антибактеријску активност како према грам позитивним, тако и према грам негативним бактеријским сојевима, при чему су  $\alpha$ -метилбутирилшиконин и ацетилшиконин показали најзначајнију активност према свим тестираним бактеријским сојевима.
- ✓ Липофилна природа изолованих нафтохинона значајно утиче на њихову биорасположивост и фармацеутску ефикасност. Такође, треба нагласити и ограничења у погледу стабилности једињења под дејством кисеоника из ваздуха, температуре и UV зрачења. У циљу увећања биолошке активности нафтохинона искоришћена је могућност њихове енкапсулације унутар хидрофобне шупљине молекула  $\beta$ -CD. Од свих

тестираних нафтохинона ацетилшиконин је показао најбољу биолошку активност, па је испитана могућност његове енкапсулације у молекула β-CD. Резултати UV-Vis, IR и <sup>1</sup>H NMR спектроскопије, рендгенске дифрактометрије праха (XPRD), као и скенирајуће електронске микроскопије (SEM) показали су да је добијен бинарни систем ацетилшиконин/β-CD. Тест фазне растворљивости показао је да је добијен инклузиони систем A<sub>L</sub>-типа, као и да је однос субстрат/лиганд 1:1 М/М.

- ✓ Како би потврдили да ли је енкапсулацијом (повећањем биорасположивости) повећана биолошка активност, испитано је цитотоксично дејство енкапсулираног и слободног ацетилшиконина. На основу МТТ теста утврђено је да је цитотоксичност ацетилшиконина према НТС-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама канцера у дужим треманима значајно повећана енкапсулацијом, односно увећањем биорасположивости активне супстанце.
- ✓ Резултати клоногеног теста показали су да ацетилшиконин из бинарног система показује много јачу могућност инхибиције клоногеног преживљавања на обе ћелијске линије (НТС-116 и MDA-MB-231) у поређењу са слободним ацетилшиконом.
- ✓ Анализа ћелијског циклуса показује да третман инклузионим системом у обе тестиране ћелијске линије индукује јачи застој у ћелијском циклусу у поређењу са третманом слободним ацетилшиконом.
- ✓ Испитан је ефекат слободног ацетилшиконина и његовог инклузионог комплекса на продукцију интрацелуларних реактивних кисеоничних врста (ROS) у НТС-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Резултати су показали да третман инклузионим комплексом у поређењу са третманом слободним ацетилшиконом повећава продукцију ROS-а, при чему је код НТС-116 ћелија продукција 1,3 пута већа, односно код MDA-MB-231 ћелија 1,1 пута већа.
- ✓ Апоптотски ефекат ацетилшиконина из инклузионог система испитан је анализом експресије кључних апоптотских протеина Bcl-2, Вах и активне каспазе-3, и упоређен са апоптотским ефектом у ћелијама третираним слободним ацетилшиконом. Резултати су показали да у третману НТС-116 ћелија енкапсулираним и слободним ацетилшиконом долази до смањења односа Bcl-2/Вах у поређењу са контролним ћелијама, односно повећава се проценат ћелија код којих долази до експресије активне каспазе-3. Третман MDA-MB-231 ћелија енкапсулираним и слободним

ацетилшиконином није показао значајан ефекат на експресију протеина Bcl-2, Вах и активне каспазе-3. На истим ћелијама канцера испитан је и ефекат инклузионог система и слободног нафтохинона на инхибицију аутофагије. Оба третмана, слободним ацетилшиконином и ацетилшиконином из бинарног система доводе до инхибиције аутофагије, с тим да је третман енкапсулираним нафтохиноном значајно ефикаснији у обе ћелијске линије.

Потребно је нагласити и да је рак један од главних узрока смртности према Светској здравственој организацији, а радикални приступи као што су хируршки захвати, радиотерапија или хемотерапија у контроли већине карцинома у многим случајевима се нису показали успешним. Поред тога, развој резистенције према конвенционалним антибиотицима представља један од највећих изазова за фармацеутску индустрију и здравствени сектор. Као један од кључних аспеката у циљу решавања представљених проблема намеће се и примена изолованих секундарних метаболита и биљних екстраката у третману различитих патофизиолошких стања. Резултати ове докторске дисертације указују на могућу примену изолованих нафтохинонских деривата у развоју нових антибактеријских формулација, као и у развоју нових стратегија у борби са раком дебелог црева и дојке. Такође, како је корен биљке *O. visianii* Clem врло слабо проучаван, и осим податка да је у њему констатован шиконин, до сада други литературни подаци о хемијском саставу и фармаколошкој активности ове биљке нису постојали. Стога, резултати постигнути у оквиру ове дисертације представљају и значајан допринос фармаколошком и фитохемијском опису биљке *Onosma visianii* Clem.



*6. Литература*

- [1] Boraginales Working Group. Familial Classification of the Boraginales. *Taxon*. (2016); 65, 502–522.
- [2] Binzet R., Akcin O.E. Nutlet size, shape and surface ornamentation in 14 *Onosma* species (Boraginaceae). *Acta Bot. Croat.* (2009); 68 (1), 117–126.
- [3] Naz S., Ahmad S., Ajaz R.S., Asad S.S., Siddiqi R. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Onosma hispidum*. *Microbiol. Res.* (2006); 161, 43–48.
- [4] Babula P., Adam V., Havel L., Kizek R. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Curr. Pharm. Anal.* (2009);5, 47–68.
- [5] Cohen J.I. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: evolutionary relationships, taxonomy, and patterns of character evolution. *Cladistics*. (2014);30, 139–169.
- [6] Tatić B., Blečić V. *Sistematika i filogenija viših biljaka*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd (2002).
- [7] Kubitzki K., editor 2011. *The families and genera of vascular plants Vol. X. Flowering plants*. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Berlin: Springer Nature Switzerland AG.
- [8] Chacón, J., Luebert F., Hilger H.H., Ovchinnikova S., Selvi F., Cecchi L. et al. The borage family (Boraginaceae s.str.): A revised infrafamilial classification based on new phylogenetic evidence, with emphasis on the placement of some enigmatic genera. *Taxon*. (2016); 65(3), 523–46.
- [9] Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. (2009); 161 (2); 105–21.
- [10] Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. (2016); 181 (1): 1–20.
- [11] Dresler S., Szymczak G., Wójcik M. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. *Pharm. Biol.* (2017); 55, 691–95.
- [12] Vukic M.D., Vukovic N.L., Obradovic A.D., Popovic S.Lj., Zaric M.M., Djurdjevic P.M., et al. Naphthoquinone rich *Onosma visianii* Clem (Boraginaceae) root extracts induce apoptosis and cell cycle arrest in HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines, *Nat Prod Res*, (2018) 32, 2712–16.
- [13] Gharib A., Godarzee M. Determination of secondary metabolites and antioxidant activity of some boraginaceae species growing in Iran. *Trop. J. Pharm. Res.* (2016); 15, 2459–65.
- [14] Kumar N., Kumar R., Kishore K. *Onosma L.*: A review of phytochemistry and ethnopharmacology. *Pharmacogn. Rev.* (2013); 7 (14), 140.
- [15] Özgen U., Coşkun M., Kazaz C., Seçen H. Naphthoquinones from the roots of *Onosma argentatum* Hub.-Mor. (Boraginaceae). *Turk J Chem.* (2004); 28, 451–54.



- [16] Akcin O.E., Binzet R. Micromorphological studies on nutlets of some *Onosma* L. (Boraginaceae) species from Turkey. *Pakistan J. Bot.* (2011); 43, 743–752.
- [17] Vukic M.D., Vukovic N.L., Djelic G.T., Popovic S.Lj., Zaric M.M., Baskic D.D., et al. Antibacterial and Cytotoxic Activities of Naphthoquinone Pigments from *Onosma Visianii* Clem. *EXCLI J.* (2017); 16 73-88.
- [18] Kolarčik V., Zozomová-Lihová J., Mártonfi P. Systematics and evolutionary history of the *Asterotricha* group of the genus *Onosma* (Boraginaceae) in central and southern Europe inferred from AFLP and nrDNA ITS data. *Plant Syst. Evol.* (2010); 290: 21–45.
- [19] Koyuncu O., Koray Yaylacı Ö., Zgişi K., Sezer O., Öztürk D. A new *Onosma* (Boraginaceae) species from central Anatolia, Turkey. *Plant Syst. Evol.* (2013); 299, 1839–47.
- [20] Binzet R., Akcin O.E. The anatomical properties of two *Onosma* L. (Boraginaceae) species from Turkey. *J. Med. Plants Res.* (2012); 6, 3288–94.
- [21] Cadirci, E. Suleyman H., Aksoy H., Halici Z., Ozgen U., Koc A., et al. Effects of *Onosma armeniacum* root extract on ethanol-induced oxidative stress in stomach tissue of rats. *Chem. Biol. Interact.* (2007); 170, 40–48.
- [22] Sezik E., Yeşilada E., Tabata M., Honda G., Takaishi Y., Fujita T, et al. Traditional Medicine in Turkey VIII. Folk Medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdir Provinces. *Econ. Bot.* (1997); 51 (3); 195-211.
- [23] Ahmad B., Ali N., Bashir S., Choudhary M.I., Azam S., Khan I. Parasitocidal, antifungal and antibacterial activities of *Onosma griffithii* Vatke. *Afr J Biotechnol.* (2009);8, 5084–7.
- [24] Ozgen U., Houghton P., Ogundipe Y., Coşkun M. Antioxidant and antimicrobial activities of *Onosma argentatum* and *Rubia peregrina*. *Fitoterapia* (2003); 74, 682–85.
- [25] Gautam Navneet S.S., Kumar S. Appraisal of antimicrobial properties of *Onosma bracteatum* Wall. fruit extracts against respiratory tract pathogens. *J. Med. Herbs Ethnomedicine.* (2015); 1, 108–12.
- [26] El-Shazly A., El-Domiaty M., Witte L., Wink M. Pyrrolizidine alkaloids in members of the Boraginaceae from Sinai (Egypt). *Biochem. Syst. Ecol.* (1998); 26, 619–636.
- [27] Shcherbanovskii LR. *Onosma visianii*-A new source of shikonin. *Chem Nat Compd.* (1971); 7, 491-1.
- [28] Josifović M., Stjepanović L., Janković M.M., Gajić M., Kojić M., Diklić N. 1974: *Onosma visianii* Clem. Juss In: Josifović, M. (ed.), *Flora SR Srbije*, 6: 64-66, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti. Beograd.
- [29] Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier, E. Production of plant secondary metabolites : A historical perspective. *Plant Sci.* (2001); 161, 839–51.
- [30] Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Wiley-Blackwell. (2006).
- [31] Murakami K., Haneda M., Iwata S., Yoshino M. Effect of hydroxy substituent on the prooxidant action of naphthoquinone compounds. *Toxicol in Vitro.* (2010); 24, 905-09.

- [32] Tiwari R., Rana C.S. Plant secondary metabolites: a review. *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.* (2015); 3, 661–70.
- [33] Ahmad I., Nawaz S.A., Afza N., Malik A., Fatima I., Sher Bahadar K., et al. Isolation of Onosmins A and B, Lipoxygenase Inhibitors from *Onosma hispidum*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*; (2005) 53; 907-10.
- [34] Ahmad V.U., Kousar F., Khan A., Zubair M., Iqbal S., Tareen R.B. A New Ketone and a Known Anticancer Triterpenoid from the Leaves of *Onosma limitaneum*. *Helvetica.* (2005); 88 (2); 309-11.
- [35] Ahmad, I., Anis I., Malik A., Nawaz S.A., Choudhary M.I. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispidum*. *Chem. Pharm Bull.* (2003); 51, 412-4.
- [36] Gianni S., Gloria C., Dario G., Giorgio G., Filippo M., Massimo R., et. al. Alkannin/shikonin mixture from roots of *Onosma echioides* (L.) L.: Extraction method study and quantification. *J. Sep. Sci.* (2008); 31, 945–52.
- [37] Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Samanidou V. F., Papadoyannis I.N. Analytical Methods for the Determination of Alkannins and Shikonins. *Current Organic Chemistry*, 2006, 10, 583-622.
- [38] Tatjana K., Tatjana S., Zorica J., Nada K. Cytotoxicity in vitro of Naphthazarin Derivatives from *Onosma arenaria*. *Phytother. Res.* (2006) 20; 602–04.
- [39] Teisa T., Harilaos D., Konstantia G., Ioanna C. Comparative Study of Naphthoquinone Contents of Selected Greek Endemic Boraginaceae Plants - Antimicrobial Activities. *Nat. Prod. Comm.* (2017): 12 (2), 179–80.
- [40] Safavi F., Farimani M.M., Golalipour M., Leung P.-C., Lau K.-M., Kwok H.-F., et al. Investigations on the wound healing properties of *Onosma dichroantha* Boiss root extracts. *South African Journal of Botany.* (2019); 125, 344–52.
- [41] Hu Y., Jiang Z., Leung K.S., Zhao Z. Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* (2006); 577, 26–31.
- [42] Nadine K., Beate R., Alexander J. A. D., Birgit L., Heike K., Olaf K., et al. Naphthoquinones from *Onosma paniculata* Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells. *J. Nat. Prod.* (2012); 75, 865–69.
- [43] Kundakovic T., Fokialakis N., Dobric S., Pratsinis H., Kletsas D., Kovacevic N., et al. Evaluation of the anti-inflammatory and cytotoxic activities of naphthazarine derivatives from *Onosma leptantha*. *Phytomedicine.* (2006); 13(4), 290-94.
- [44] Ozgen U., Miloglu F.D., Bulut G. Quantitative determination of shikonin derivatives with UV-Vis spectrophotometric methods in the roots of *Onosma nigricaulis*. *Reviews in Analytical Chemistry.* (2011); 30 (2), 59–63.
- [45] Ozgen U., Iqbal M., Hacimuftuoglu A., Houghton P.J., Gocer F., Dogan H., et al. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. *Journal of Ethnopharmacology.* (2006); 104 (1–2), 100-03.

- [46] Wellington, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. *RSC Adv.* (2015); 5, 20309–38.
- [47] Willow J.H. Liu. Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies. *Nat. Prod.* (2011).
- [48] Malik S., Bhushan S., Sharma M., Ahuja, P.S. Biotechnological approaches to the production of shikonins: A critical review with recent updates. *Crit. Rev. Biotechnol.* (2016); 36, 327–40.
- [49] López-López L.I., Nery-Flores D.S., Silva-Belmares, Y.S., Sáenz-Galindo A. Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives — A structured review. *Vitae.* (2014); 21, 248–258.
- [50] Hook I., Mills C., Sheridan H. Bioactive naphthoquinones from higher plants. *Studies in Natural Products Chemistry Elsevier B.V.*(2014); 41.
- [51] Widhalm J.R., Rhodes D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic. Res.* (2016);3.
- [52] Mbaveng A.T. Kuete V. Review of the chemistry and pharmacology of 7-Methyljugulone. *Afr. Health Sci.* (2014); 14, 201–205.
- [53] Qiu H.Y., Wang P.F., Lin H.Y., Tang C.Y., Zhu H.L., Yang Y.H. Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chem Biol Drug Des.* (2018); 91(3), 681-90.
- [54] Ramos-Peralta L., López-López L.I., Silva-Belmares S.Y., Zugasti-Cruz A., Rodríguez-Herrera R., Aguilar-González C.N. Naphthoquinone: Bioactivity and Green Synthesis. *Basic Sci Technol Adv Educ Programs.* 2015; 542–50.
- [55] Pinto A.V., De Castro S.L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. *Molecules.* (2009); 14, 4570–4590.
- [56] Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaou K. C. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (1999);38, 270–300.
- [57] Yang J.T., Li Z.L., Wu J.Y., Lu F.J., Chen C.H. An Oxidative Stress Mechanism of Shikonin in Human Glioma Cells. *PloS one.*(2014); 9, e94180.
- [58] Miller M.G., Rodgers A., Cohen G.M. Mechanisms of toxicity of naphthoquinones to isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacology.* (1986); 35(7), 1177-84.
- [59] Cheng Y.W., Chang C.Y., Lin K.L., Hu C.M., Lin C.H., Kang J.J. Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-κB signaling. *Journal of Ethnopharmacology.* (2008); 120, 264–271.
- [60] Kourounakis A. P., Assimopoulou A. N., Papageorgiou V. P., Gavalas, A., Kourounakis P. N. Alkannin and shikonin: Effect on free radical processes and on inflammation - A preliminary pharmacochemical investigation. *Arch. Pharm. (Weinheim).* (2002); 335, 262–266.

- [61] Thomson R.H. Naturally Occurring Quinones IV Recent advances. *Phytochemistry*. Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE18HN, UK Chapman, (1972); 11.
- [62] Andújar I., Rios J.-L., Giner R., Recio M. Pharmacological Properties of Shikonin - A Review of Literature since 2002. *Planta medica*. (2013). 79;1685–97.
- [63] Yan Fang-Jie, Qian Mei-Jia, Luo Hong, Zeng Chen-Ming, Yuan Tao, He Qiao-Jun, Zhu Hong, Yang Bo. A novel natural compound Shikonin inhibits YAP function by activating AMPK. *TMR Modern Herbal Medicine*, 2018, 1(3): 136-142.
- [64] Devi S.U., Ashokkumar K., Dhivya S. Anticancer, Antimicrobial and other Pharmacological Properties of Shikonin and its Derivatives. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. (2016); 8 (9), 1458-64.
- [65] Papageorgioua V.P., Assimopoulou A.N., Samanidou V. F., Papadoyannis I.N. Recent Advances in Chemistry, Biology and Biotechnology of Alkannins and Shikonins. *Current Organic Chemistry*. (2006); 10, 2123-42.
- [66] Cho M.H., Paik Y.S., Hahn T.R. Physical Stability of Shikonin Derivatives from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon* Cultivated in Korea. *J. Agric. Food Chem*. (1999), 47(10), 4117-20.
- [67] Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. Preparation and release studies of alkannin-containing microcapsules. *J Microencapsul*. (2004); 21(2):161-73.
- [68] Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. Encapsulation of isohexenylnaphthazarins in cyclodextrins. *Biomed. Chromatogr*. (2004); 18, 240-247.
- [69] Singh R., Gara R., Bhardwaj P., Kaachra A., Malik S., Kumar R., et al. Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, p-hydroxybenzoate-m-geranyltransferase and genes of phenylpropanoid pathway exhibits positive correlation with shikonins content in arnebia [*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston]. *BMC molecular biology*. (2010); 11, 88.
- [70] Boulos J.C., Rahama M., Hegazy M.-E.F., Efferth T. Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy. *Cancer Letters*. (2019); 459, 248-67.
- [71] Wang F., Yao X., Zhang Y., Tang J. Synthesis, biological function and evaluation of Shikonin in cancer therapy. *Fitoterapia*, (2019); 134: 329–39.
- [72] Paul M. D., *Medicinal Natural Products, A biosynthetic approach*; (2ed); School of Pharmaceutical Science, University of Nottingham; UK.
- [73] Okamoto T., Yazaki K., Tabata M. Biosynthesis of shikonin derivatives from L-phenylalanine via deoxyshikonin in *Lithospermum* cell cultures and cellfree extracts. *Phytochemistry*. (1995) 38, 83- 88.
- [74] Zhu X., Skoneczny D., Weidenhamer J.D., Mwendwa J.M., Weston P.A., Gurr G.M. et al. Identification and localization of bioactive naphthoquinones in the roots and rhizosphere of Paterson's curse (*Echium plantagineum*), a noxious invader. *J. Exp. Bot*. (2016); 67, 3777–3788.

- [75] Moellering R.C., Graybill J.R., McGowan J.E., Corey L. Antimicrobial resistance prevention initiative—an update: Proceedings of an expert panel on resistance. *American journal of infection control.* (2007); 35(9), S1-S23.
- [76] Kumar V. P., Chauhan N.S., Padh H., Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* (2006); 107, 182–88.
- [77] Damianakos H., Kretschmer N., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Bauer R. Chinou Ioanna. Antimicrobial and Cytotoxic Isohexenylnaphthazarins from *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. (Boraginaceae) Callus and Cell Suspension Culture. *Molecules.* (2012); 17, 14310-22.
- [78] Kuo H.M., Hsia T.C., Chuang Y.C., Lu H.F., Lin S.Y., Chung J.G. Shikonin inhibits the growth and N-acetylation of 2-aminofluorene in *Helicobacter pylori* from ulcer patients. *Anticancer Res.* (2004); 24, 1587–92.
- [79] Sasaki K., Abe H., Yoshizaki F. In Vitro Antifungal Activity of Naphthoquinone Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* (2002); 25(5), 669-70.
- [80] DeVita Jr, V.T., Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research.* (2008); 68(21), 8643-53.
- [81] Chang I.C., Huang Y.J., Chiang T.I., Yeh C.W., Hsu L.S. Shikonin Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway in Osteosarcoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2010); 33(5), 816-24.
- [82] Duan D., Zhang B., Yao J., Liu Y., Fang J. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.* (2014); 70,182-93.
- [83] Jing H., Sun W., Fan J., Zhang Y., Yang J. JIA J., et al. Shikonin induces apoptosis of HaCaT cells via the mitochondrial, Erk and Akt pathways. *Mol. Med. Rep.* (2016); 13, 3009-16.
- [84] Gong K., Li W. Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: A potential new treatment for hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med.* (2011); 51, 2259-71.
- [85] Yeh C.C., Kuo H.M., Li T.M., Lin J.P., Yu F.S., Lu H.F., et al. Shikonin-induced Apoptosis Involves Caspase-3 Activity in a Human Bladder Cancer Cell Line (T24). *in vivo* (2007); 21, 1011-20.
- [86] Yang Q., Ji M., Guan H., Shi B., Hou P. Shikonin Inhibits Thyroid Cancer Cell Growth and Invasiveness Through Targeting Major Signaling Pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* (2013); 98(12), E1909–E1917
- [87] Wu Z., Wu L., Li L., Tashiro S., Onodera S., Ikejima T. p53-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Shikonin via a Caspase-9-Dependent Mechanism in Human Malignant Melanoma A375-S2 Cells. *J Pharmacol Sci.* (2004); 94, 166 -76.
- [88] Wang Y., Zhou Y., Jia G., Han B., Liu J., Teng Y., et al. Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: Involvement of NF-kB signaling pathway. *Biochem. Pharm.* (2014); 88, 322-33.

- [89] Mao X., Yu C.R., Li W.H., Li W.X. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. *Cell Research* (2008); 18, 879-88.
- [90] Balvan J, Krizova A, Gumulec J, Raudenska M, Sladek Z, Sedlackova M, et al. Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PLoS ONE*. (2015); 10(3), e0121674. pmid:25803711
- [91] Wang H., Liu Z., Li X., Zhao R., Pu Y., Wu H., Guan W. Shikonin causes apoptosis by disrupting intracellular calcium homeostasis and mitochondrial function in human hepatoma cells. *Exp. Ther. Med.* (2018); 15, 1484–92.
- [92] Lin K.H., Huang M.Y., Cheng W.C., Wang S.C., Fang S.H., Tu H.P., et al. RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment. *Sci. Rep.* (2018); 8, 2672.
- [93] Tang J.C., Zhao J., Long F., Chen J.-Y., Mu B., Jiang Z., Ren Y., et al. Efficacy of shikonin against esophageal cancer cells and its possible mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *J. Cancer.* (2018); 9, 32.
- [94] Li M.Y., Mi C., Wang K.S., Wang Z., Zuo H.X., Piao L.X., et al. Shikonin suppresses proliferation and induces cell cycle arrest through the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling. *Chem. Biol. Interact.* (2017); 274, 58–67.
- [95] Lan W., Wan S., Gu W., Wang H., Zhou S. Mechanisms behind the inhibition of lung adenocarcinoma cell by shikonin. *Cell Biochem. Biophys.* (2014); 70, 1459–67.
- [96] Kim S.J., Kim J.M., Shim S.H., Chang H.I. Shikonin induces cell cycle arrest in human gastric cancer (AGS) by early growth response 1 (Egr1)-mediated p21 gene expression. *J. Ethnopharmacol.* (2014); 151, 1064–71.
- [97] Lu B., Wang Z., Ding Y., Wang X., Lu S., Wang C., et al. Rip1 and rip3 contribute to shikonin-induced glycolysis suppression in glioma cells via increase of intracellular hydrogen peroxide. *Cancer Lett.* (2018); 425, 31–42.
- [98] Shilnikova K., Piao M.J., Kang K.A., Ryu Y.S., Park J.E., Hyun Y.J. et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and attenuates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Oncol. Lett.* (2018); 15, 5417–24.
- [99] Chen J., Hu X., Cui J. Shikonin, vitamin K3 and vitamin K5 inhibit multiple glycolytic enzymes in MCF-7 cells. *Oncol. Lett.* (2018); 15, 7423–32.
- [100] Spyrelli E.D., Kyriazou A.V., Virgiliou C., Nakas A., Deda O., Papageorgiou V.P., et al. Metabolic profiling study of shikonin's cytotoxic activity in the Huh7 human hepatoma cell line. *Mol. Biosyst.* (2017); 13, 841–51.
- [101] Li W., Liu J., Zhao Y. PKM2 inhibitor shikonin suppresses TPA-induced mitochondrial malfunction and proliferation of skin epidermal JB6 cells. *Mol. Carcinog.* (2014); 53, 403–12.
- [102] Chen J., Xie J., Jiang Z., Wang B., Wang Y., Hu X. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene.* (2011); 30, 4297.

- [103] Hsieh Y.S., Liao C.H., Chen W.S., Pai J.T., Weng M.S. Shikonin inhibited migration and invasion of human lung cancer cells via suppression of c-Met-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, *J. Cell. Biochem.* (2017); 118, 4639–51.
- [104] Deng B., Feng Y., Deng B. TIPE2 mediates the suppressive effects of shikonin on MMP13 in osteosarcoma cells, *Cell. Physiol. Biochem.* (2015); 37, 2434–43.
- [105] Hao Z., Qian J., Yang J. Shikonin induces apoptosis and inhibits migration of ovarian carcinoma cells by inhibiting the phosphorylation of Src and FAK. *Oncol. Lett.* (2015); 9, 629–33.
- [106] Guo J., Chen X.F., Liu J., Lin H.Y., Han H.W., Liu H.C. et al. Novel shikonin derivatives targeting tubulin as anticancer agents. *Chem. Biol. Drug Des.* (2014); 84, 603–15.
- [107] Jang S.Y., Lee J.K., Jang E.H., Jeong S.Y., Kim J.-H. Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation. *Oncol. Rep.* (2014); 31, 2827–33.
- [108] Wang H., Wu C., Wan S., Zhang H., Zhou S., Liu G. Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin  $\beta$ 1 expression and the ERK1/2 signaling pathway. *Toxicology.* (2013); 308, 104–12.
- [109] Min R., Zun Z., Min Y., Wenhui D., Wenjun Y., Chenping Z. Shikonin inhibits tumor invasion via down-regulation of NF- $\kappa$ B-mediated MMP-9 expression in human ACC-M cells. *Oral Dis.* (2011); 17, 362–69.
- [110] Subbaramaiah K., Bulic P., Lin Y., Dannenberg A.J., Pasco D.S. Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *J. Biomol. Screen.* (2001); 6, 101–10.
- [111] Lee H.J., Lee H.J., Magesh V., Nam D., Lee E.O., Ahn K.S. et al. Shikonin, acetylshikonin, and isobutyroylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinomabearing mice. *Yakugaku Zasshi.* (2008); 128, 1681–88.
- [112] Shi S., Cao H. Shikonin promotes autophagy in BXPC-3 human pancreatic cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol. Lett.* (2014); 8, 1087–89.
- [113] Sankawa U., Ebizuka Y., Miyazaki T., Isomura Y., Otsuka H., Shibata S., et al. Antitumor activity of shikonin and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* (1977); 25(9), 2392–95.
- [114] Guo X.P., Zhang X.Y., Zhang S.D. Clinical trial on the effects of shikonin mixture on late stage lung cancer. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* (1991); 11(10), 598–9.
- [115] Andújar I., Martí-Rodrigo A., Giner R.M., Ríos J.L., Recio M.C. Shikonin prevents early phase inflammation associated with azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Planta Med.* (2018); 84, 674–683.
- [116] Chen X., Yang L., Oppenheim J.J., Howard M.Z. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother Res.* (2002); 16(3), 199–209.
- [117] Moore H.W. Bioactivation as a Model for Drug Design Bioreductive Alkylation. *Science.* (1977); 197, 527–32.

- [118] Papageorgiou V.P. Wound healing properties of naphthaquinone pigments from *Alkanna tinctorial*. *Experientia* (1978) 34, 1499
- [119] Weng X.C., Xiang G.Q., Jiang A.L., Liu Y.P., Wu L.L., Dong X.W. et al. Antioxidant properties of components extracted from puccoon (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.). *Food Chem* (2000); 69: 143–46.
- [120] Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. Radical Scavenging Activity of *Alkanna tinctoria* Root Extracts and their Main Constituents, Hydroxynaphthoquinones. *Phytother. Res.* (2005); 19: 141–47.
- [121] Ordoudi S.A., Tsermentseli S.K., Nenadis N., Assimopoulou A.N. Tsimidou M.Z., Papageorgiou V.P. Structure-radical scavenging activity relationship of alkannin/shikonin derivatives. *Food Chemistry*. (2011); 124: 171–76.
- [122] Gao D., Kakuma M., Oka S., Sugino K., Sakurai H. Reaction of  $\beta$ -alkannin (shikonin) with reactive oxygen species: detection of  $\beta$ -alkannin free radicals. *Bioorgan Med Chem.* (2000); 8: 2561–69.
- [123] Nishizawa M., Kohno M., Nishimura M., Kitagawa A., Niwano Y. Presence of peroxyradicals in cigarette smoke and the scavenging effect of shikonin, a naphthoquinone pigment. *Chem Pharm Bull.* (2005); 53: 796–99.
- [124] Jansooka P., Ogawab N., Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics.* (2018); 535: 272–84.
- [125] Crini G., Fourmentin S., Fenyvesi É., Torri G., Fourmentin M., Morin-Crini N. (2018) Fundamentals and Applications of Cyclodextrins. In: Fourmentin S., Crini G., Lichtfouse E. (eds) *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis. Environmental Chemistry for a Sustainable World*, vol 16. Springer, Cham.
- [126] Saha S., Roy A., Roy K. Roy M.N. Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Sci Rep.* (2016); 6, 35764
- [127] Hedges A. Cyclodextrins: Properties and Application, in: BeMiller J and Whistler R, Stach: *Chemistry & Technology.* (2009); 833-851.
- [128] Chaudhari P., Ghate V.M., Lewis S.A. Supramolecular cyclodextrin complex: Diversity, safety, and applications in ocular therapeutics. *Exp Eye Res.* (2019); 189:107829.
- [129] Carneiro S.B., Costa Duarte F.Í., Heimfarth L., Siqueira Quintans J.S., Quintans-Júnior L.J., Veiga Júnior V.F.D. et al. Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *Int J Mol Sci.* (2019); 20: 642.
- [130] Calabro M.L., Tommasini S., Donato P., Raneri D., Stancanelli R., Ficarra P., et al. Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* (2004); 35, 365-77.
- [131] Higuchi T., Connors K.A. Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation.* (1965); 4, 117-22.



- [132] Freshney R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, Alan R. Liss, Inc New York, 1983.
- [133] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. (1983); 65, 55-63.
- [134] Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., Bree C.v. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. (2006); 1(5), 2315-19.
- [135] Shounan Y., Feng X., O'Connell P.J. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. (1998); 217(1-2), 61-70.
- [136] Shirali S., Aghaei M., Shabani M., Fathi M., Sohrabi M., Moeinifard M. Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tumor Biology*. (2013); 34(2), 1085-95.117
- [137] Loos C., Syrovets T., Mysyanovych A., Mailänder V., Landfester K., Simmet T. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials*. (2014); 35(6), 1944-53.
- [138] Krishan A. J. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *Cell Biol*. (1975); 66(1), 188-93.
- [139] Yang H.W., Hwang K.J., Kwon H.C., Kim H.S., Choi K.W., Oh, K.S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction*. (1998); 13, 998-1002.
- [140] Qin Y., Lu M., Gong X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int*. (2008); 32, 224-28.
- [141] Auclair C., Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction, in Greenwald, R. A. (Eds.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, BocaRaton, CRC Press.(1985); 123-132.
- [142] Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*. (1879); 12, 426-28.
- [143] Baker M.A., Cerniglia G.J., Zaman, A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem*. (1990); 190, 360-65.
- [144] Sirajuddin M., Ali S., Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B*. (2013); 124, 1-19.
- [145] Wu S.S., Yuan W.B., Wang H.Y., Zhang Q., Liu M., Yu K.B. Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (N,N'-dibenzylethane-1,2-diamine) transition metal complexes. *Inorg. Biochem*. (2008); 102, 2026-34.
- [146] Lakowicz J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edn. Plenum Press, New York (2006).

- [147] Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* (2009); 30, 2785–91.
- [148] Wenskowsky L., Schreuder H., Derdau V., Matter H., Volkmar J., Nazare M., et al. Identification and Characterization of a Single High-Affinity Fatty Acid Binding Site in Human Serum Albumin. *Angew.* (2018); 57, 1044-48.
- [149] Vandevenne M.S., Jacques D.A., Artuz C., Nguyen C.D., Kwan A.H.Y., Segal D.J., et al. New Insights into DNA Recognition by Zinc Fingers Revealed by Structural Analysis of the Oncoprotein ZNF217. *J Biol Chem.* (2013); 288, 10616–27.
- [150] BIOVIA, Dassault Systèmes. "Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes." 2017.
- [151] Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., et al. Fox, Gaussian 09. Revision C.01. Inc, Wallingford CT. 2013.
- [152] Andrews, J.M. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* (2005); 56, 60-76.
- [153] Clinical and Laboratory Standards Institute, Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI Document: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; informational supplement Vol. 30, M100-S20. No. 1. 20th ed. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- [154] Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI Document: Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; informational supplement M100-S21. 21th ed. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- [155] Leung A.Y., Foster, S. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients.* (1996). New York: Wiley.
- [156] Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol 6. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1988.
- [157] Kretschmer N., Rinner B., Deutsch A.J., Lohberger B., Knausz H., Kunert O., et al. Naphthoquinones from *Onosma.paniculata* induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma Cells. *J Nat Prod.* (2012);75:865-9.
- [158] Ozgen U., Coskun M., Kazaz C., Secen H. Naphthoquinones from the Roots of *Onosma argentatum* Hub.- Mor. (Boraginaceae). *Turk J Chem.* (2004); 28:451-4.
- [159] Albrecht A., Vovk I., Simonovska B., Srbinska M. Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *J Chromatogr A.* (2009); 1216:3156-62.
- [160] Wang L., Li F., Liu X., Chen B., Yu K., Wang M.K. Meroterpenoids and a naphthoquinone from *Arnebia euchroma* and their cytotoxic activity. *Planta Med.* (2015); 81:320-6.
- [161] Zhou W., Peng Y., Li S.S. Semi-synthesis and anti-tumor activity of 5,8-O-dimethyl acylshikonin derivatives. *Eur J Med Chem.* (2010); 45:6005-11.

- [162] Kastan M.B, Bartek J. Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature*. (2004); 432:316–23.
- [163] Taylor W.R, Stark G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. (2001); 20:1803–1815.
- [164] Al-Ejeh F., Kumar R., Wiegmanns A., Lakhani S.R., Brown M.P., Khanna K.K. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene*. (2010); 29:6085–98.
- [165] Huang X., Traganos F., Darzynkiewicz Z. DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell Cycle*. (2003); 2:614–619.
- [166] Clifford B., Beljin M., Stark G.R., Taylor W.R. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res*. (2003); 63:4074–81.
- [167] Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. (2000); 100:57-70.
- [168] Narang A.S., Desai D.S. Anticancer drug development. In: Lu Y, Mahato RI (eds.): *Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics*. New York: Springer, (2009); (pp 49-92).
- [169] Pan S.T., Qin Y., Zhou Z.W., He Z.X., Zhang X., Yang T., et al. Plumbagin induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways in human tongue squamous cell carcinoma cells. *Drug Des Develop Ther*. (2015); 9: 1601-26.
- [170] Liu H., Liu X., Zhang C., Zhu H., Xu Q., Bu Y., et al. Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *J Cancer*. (2017); 8:1586-97.
- [171] Liu Q., Chan S.T., Mahendran R. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*. (2003); 24, 637-42.
- [172] Kang J.J., Lee P.J., Chen Y.J., Lee C.C., Li C.H., Cheng H.W., et al. Naphthazarin and methylnaphthazarin cause vascular dysfunction by impairment of endothelium-derived nitric oxide and increased superoxide anion generation. *Toxicol In Vitro*. (2006); 20(1):43-51.
- [173] Traverso N., Ricciarelli R., Nitti M., Marengo B., Furfaro A.L., Pronzato, M.A., et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid. Med. Cell Longev*. (2013); 2013, 972913
- [174] Chung B.Y., Choi S.R., Moon I.J., Park C.W., Kim Y.H., Chang S.E. The glutathione derivative, GSH monoethyl ester, may effectively whiten skin but GSH does not. *Int J Mol Sci*. (2016); 17: 629.
- [175] Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Meth Enzymol*. (2002); 348:93-112.
- [176] Shizhong Z., Fu Y., Anping C. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit HSC activation. *Free Radic Biol Med*. (2007); 43:444-53.
- [177] Shi M.M., Iwamoto T., Forman H.J.  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am J Physiol*. (1994); 267:414-21.

- [178] Colin D.J., Limagne E., Ragot K., Lizard G., Ghiringhelli F., Solary É., et al. The role of reactive oxygen species and subsequent DNA-damage response in the emergence of resistance towards resveratrol in colon cancer models. *Cell Death Dis.* (2014); 5:e1533.
- [179] Graziewicz M., Wink D.A., Laval F.. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis.* (1996); 17:2501-05.
- [180] Venmathy P., Jeyasundari J., Vasantha V. S., Nandha Kumar P., Sakthi M. Interaction of two flavonoids with calf thymus DNA: A multi-spectroscopic, electrochemical and molecular modelling approach. *Eur. Chem. Bull.*, (2018); 7(1), 10-19.
- [181] Vaverkova V., Vrana O., Adam V., Pekarek T., Jampilek J., Babula P. The Study of Naphthoquinones and Their Complexes with DNA by Using Raman Spectroscopy and Surface Enhanced Raman Spectroscopy: New Insight into Interactions of DNA with Plant Secondary Metabolites. *Biomed Res Int.* (2014) ;2014:461393.
- [182] Sarwar T., Husain M.A., Rehman S.U., Ishqi H.M., Tabish M. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA. *Mol BioSyst.* (2015); 11:522-31.
- [183] Jali B.R., Kuang Y., Neamati N., Baruah J.B. Selective binding of naphthoquinone derivatives to serum albumin proteins and their effects on cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* (2014); 214:10-7. Yan X, Yuan D, Pan D. Interactions of Bromocarbazoles with Human Serum Albumin Using Spectroscopic Methods. *Molecules.* (2018); 23:3120.
- [184] Qiao C., Bi S., Sun Y., Song D., Zhang H., Zhou W. Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* (2008); 70:136–43
- [185] Labieniec M., Gabryelak T. Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* (2006); 82:72–78.
- [186] Cox P.J., Psomas G., Bolos C.A. Characterization and DNA-interaction studies of 1,1-dicyano-2,2-ethylene dithiolate Ni(II) mixed-ligand complexes with 2-amino-5-methyl thiazole, 2-amino-2-thiazoline and imidazole. Crystal structure of [Ni(i-MNT)(2a-5mt)<sub>2</sub>]. *Bioorg Med Chem Lett.* (2009); 17:6054–62.
- [187] Wu J., Apontes P., Song L., Liang P., Yang L., Li F. Molecular mechanism of upregulation of survivin transcription by the AT-rich DNA-binding ligand, Hoechst33342: evidence for survivin involvement in drug resistance. *Nucleic Acids Res.* (2007); 35:2390–402.
- [188] Bi S., Qiao C., Song D., Tian Y., Gao D., Sun Y., et al. Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe. *Sens Actuator B-Chem.* (2006); 119:199–208.
- [189] Rehman M.T., Khan A.U. Understanding the interaction between human serum albumin and anti-bacterial/ anti-cancer compounds. *Curr Pharm Des.* (2015); 21(14):1785-99
- [190] Yasseen Z.J, Ghossain M.E. Studies on Binding of Widely used Drugs with Human Serum Albumin at Different Temperatures and PHs. *J Biomedical Sci.* (2016); 5:3.

- [191] Panigrahi G.K., Suthar M.K., Verma N., Asthana S., Tripathi A., Gupta S.K., et al. Investigation of the interaction of anthraquinones of *Cassia occidentalis* seeds with bovine serum albumin by molecular docking and spectroscopic analysis: Correlation to their in vitro cytotoxic potential. *Food Res Int.* (2015); 77:368-77.
- [192] Liu Y., Wang J.-B., Xiao X.-H., Qu S.-S. Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2004); 36(4), 915–919.
- [193] Cao X., Yang Z., He Y., Xia Y., He Y., Liu J. Multispectroscopic exploration and molecular docking analysis on interaction of eriocitrin with bovine serum albumin. *J Mol Recognit.* 2019;32:e2779.
- [194] Yan X., Yuan D., Pan D. Interactions of Bromocarbazoles with Human Serum Albumin Using Spectroscopic Methods. *Molecules.* 2018;23:3120.
- [195] Kandagal P.B., Ashoka S., Seetharamappa J., Shaikh S.M., Jadegoud Y., Ijare O.B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *J Pharm Biomed Anal.* (2006);41(2):393-99.
- [196] Wang Y.Q., Zhang H.M., Zhang G.C., Ta W.H., Tang, S.H. Binding of brucine to human serum albumin. *Journal of molecular structure.* (2007); 830(1-3), 40-45.
- [197] He W., Li Y., Tian J., Liu H., Hu Z., Chen X. Spectroscopic studies on binding of shikonin to human serum albumin. *J Photochem Photobiol A Chem.* (2005); 174:53–61.
- [198] Makarska-Bialokoz M., Lipke A. Study of the binding interactions between uric acid and bovine serum albumin using multiple spectroscopic techniques. *J Mol Liq.* (2019); 276:595-604.
- [199] Noundou X.S., Krause R.W., van Vuuren S.F., Ndinteh D.T., Olivier D.K. Antibacterial effects of *Alchornea cordifolia* (Schumach. and Thonn.) Müll. Arg extracts and compounds on gastrointestinal, skin, respiratory and urinary tract pathogens. *J Ethnopharmacol.* (2016); 179:76-82.
- [200] Brigham L.A., Michaels P.J., Flores H.E. Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol.* (1999); 119, 417-428.
- [201] Ding X., Yin B., Qian L., Zeng Z., Yang Z., Li H., et al. Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Med Microbiol.* (2011); 60:1827-34.
- [202] Zhang L., Man S., Qiu H., Liu Z., Zhang M., Ma L., et al. Curcumin-cyclodextrin complexes enhanced the anti-cancer effects of curcumin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2016); 48, 31-38.
- [203] Cheirsilp B., Rakmai J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biol. Eng. Med.* (2016); 2(1), 1-6.
- [204] Shanmuga priya A., Balakrishnan S. B. Veerakanellore G.B., Stalin T., In-vitro dissolution rate and molecular docking studies of cabergoline drug with  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Mol. Struct.* (2018); 1160, 1-8.

- [205] Rosa C.G.D, Caroline Borges D., Zambiasi R.C., Nunes M.R., Benvenuttic E.V., Luza S.R.D., et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. *Ind. Crops. Prod.* (2013); 46: 138-46.
- [206] Amruta, T., Nancy, P., Prashant, K., Niteshkumar, S. Encapsulation of boswellic acid with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Synthesis, characterization, in vitro drug release and molecular modelling studies. *J. Mol. Struct.* (2018); 1154: 504-10.
- [207] Li Q., Pu H., Tang P., Tang B., Sun Q., Li H. Propyl gallate/cyclodextrin supramolecular complexes with enhanced solubility and radical scavenging capacity. *Food Chem.* (2018); 245: 1062-69.
- [208] Higuchi T., Connors K.A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* (1965); 4: 117-22.
- [209] Zyzelewicz D., Oracz J., Kaczmarska M., Budryn G., Grzelczyk J. Preparation and characterization of inclusion complex of (+)-catechin with  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Res. Int.* (2018); 113: 263-268.
- [210] Deavall D.G., Martin E.A., Horner J.M., Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J. Toxicol.* (2012); 1-13.
- [211] Papaliagkas V., Anogianaki A., Anogianakis G., Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia.* (2007); 11(3): 108-113.
- [212] Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* (2006); 10(1): 51-64.
- [213] Mulcahy Levy J.M., Zahedi S., Griesinger A.M., Morin A., Davies K. D., Aisner D. L., et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *eLife.* (2017); 6 (e19671): 1-24.



*Биографија*



Милена Д. Вукић је рођена 23. марта 1990. године у Крагујевцу. Основну школу „21. октобар“ и средњу школу „Прва крагујевачка гимназија“ завршила је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер истраживање и развој, уписала се 2009/10 године где је и дипломирала у октобру 2013. године, са просечном оценом у току студија 8,92, стекавши звање *дипломирани хемичар*. Мастер академске студије, смер истраживање и развој, уписала је 2013/14 године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, које је завршила у октобру 2014. године са просечном оценом 9,67 стекавши звање *мастер хемичар*. Докторске академске студије уписала је школске 2014/15 године на Природно-математичком

факултету у Крагујевцу, модул биохемија. У оквиру докторских студија положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00.

У току основних и мастер студија Милена Д. Вукић била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја (од 2010. до 2014. године). Од 29.05.2015. године до укључена је на изради пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије – „Синтезе, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала“, бр.172016. Као студент докторских студија била је стипендиста Министарства у току прве године студија (у оквиру пројекта бр. ОИ 172016). У звање истраживач-приправник изабрана је 28.01.2015. а у звање истраживач-сарадник 17.01.2018. године.

У досадашњем раду била је ангажована у извођењу практичне наставе за студенте хемије на основним академским студијама, и то у оквиру следећих предмета: Основи органске и биохемијске спектроскопије 1, Основи органске и биохемијске спектроскопије 2 и Методе анализе токсичних супстанци, а од октобра 2016. и у извођењу практичне наставе из предмета Основи токсиколошке анализе 1 и Основи токсиколошке анализе 2.





*Библиографија*

## 1. Радови у међународним часописима изузетних вредности (M21a)

- 1.1. Nenad L. Vukovic, Ana D. Obradovic, **Milena D. Vukic**, Danijela Jovanovic, Predrag M. Djurdjevic, Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines.  
*Food Research International*  
(2017) vol 106, 71-80  
**DOI:** 10.1016/j.foodres.2017.12.056  
**ISSN:** 0963-9969  
(IF 4.196 за 2017, **M21a**, Food Science & Technology 11/133)
- 1.2. **Milena D. Vukic**, Nenad L. Vukovic, Gorica T. Djelic, Ana Obradovic, Miroslava M. Kacaniova, Snezana Markovic, Suzana Popović, Dejan Baskić, Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity of different plant organs of *Eryngium serbicum* L.  
*Industrial Crops & Products*  
(2018) vol 115, 88-97  
**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.031>  
**ISSN:** 0926-6690  
(IF 3.849 за 2017, **M21a**, Agronomy 6/87 )

## 2. Радови у врхунским међународним часописима (M21)

- 2.1. Edina H. Avdović, Dejan Milenković, Jasmina M. Dimitrić Marković, Jelena Đorović, Nenad Vuković, **Milena D. Vukić**, Verica V. Jevtić, Srećko R. Trifunović, Ivan Potočňák, Zoran Marković, Synthesis, spectroscopic characterization (FT-IR, FT-Raman, and NMR), quantum chemical studies and molecular docking of 3-(1-(phenylamino)ethylidene)-chroman-2,4-dione.  
*Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*  
(2018) vol 195, 31-40  
**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.01.023>  
**ISSN:** 1386-1425  
(IF 2.880 за 2017, **M21**, Spectroscopy 7/43)
- 2.2. **Milena D Vukic**, Nenad L Vukovic, Gorica T Djelic, Suzana Lj Popovic, Milan M Zaric, Dejan D Baskic, Gordana B Krstic, Vele V Tesevic, Miroslava M Kacaniova, Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from *Onosma visianii* Clem.  
*Excli Journal*,  
(2017) vol 16, 73-78  
**DOI:** <http://dx.doi.org/10.17179/excli2016-762>  
**ISSN:** 1611-2156  
(IF 2.424 за 2017, **M21**, Biology 24/85)

2.3. **Milena D. Vukic**, Nenad L. Vukovic, Suzana Lj. Popovic, Danijela V. Todorovic, Predrag M. Djurdjevic, Sanja D. Matic, Marina M. Mitrovic, Ana M. Popovic, Miroslava M. Kacaniova, Dejan D. Baskic, Effect of  $\beta$ -cyclodextrin encapsulation on cytotoxic activity of acetylshikonin against HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines.  
*Saudi Pharmaceutical Journal*  
(2020), vol 28, pp 136-146  
**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.11.015>  
**ISSN:** 1319-0164  
(IF 3.643 za 2018, **M21**, Pharmacology & Pharmacy 65/267)

### 3. Радови у истакнутим међународним часописима (M22)

- 3.1. Edina H. Avdovic, Danijela L.J. Stojkovic, Verica V. Jevtic, Milica Kosic Biljana Ristic, Ljubica Harhaji-Trajkovic, **Milena Vukic**, Nenad Vukovic, Zoran S. Markovic, Ivan Potocnjak, Srecko R. Trifunovic,  
Synthesis, characterization and cytotoxicity of a new palladium(II) complex with a coumarin-derived ligand 3-(1-(3-hydroxypropylamino) ethylidene)chroman-2,4-dione. Crystal structure of the 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)-chroman-2,4-dione.  
*Inorganica Chimica Acta*,  
(2017) vol 466, 188-196  
**DOI:** 10.1016/j.ica.2017.06.015  
**ISSN:** 0020-1693  
(IF 2.264 za 2017, **M22**, Chemistry, Inorganic and Nuclear 16/45)
- 3.2. **Milena D. Vukic**, Nenad L. Vukovic, Ana D. Obradovic, Suzana Lj. Popovic, Milan M. Zaric, Predrag M. Djurdjevic, Snezana D. Markovic, Dejan D. Baskic,  
Naphthoquinone rich *Onosma visianii* Clem (*Boraginaceae*) root extracts induce apoptosis and cell cycle arrest in HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines.  
*Natural Product Research*  
(2018) vol 32, br. 22, pp 2712-2716  
**DOI:** <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1374271>  
**ISSN:** 1478-6419  
(IF 1.928 za 2017, **M22**, Chemistry, Applied 33/72)
- 3.3. Ana Obradović, Miloš Matić, Branka Ognjanović, Nenad Vuković, **Milena Vukić**, Predrag Djurdjevic, Gordana Ušćumlić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković,  
Anti-Tumor Mechanisms of Novel 3-(4-Substituted Benzyl)-5-Isopropil-5-Phenylhydantoin Derivatives in Human Colon Cancer Cell Line.  
*Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*  
(2019) vol 19 br. (12):1491-1502  
**DOI:** 10.2174/1871520619666190425180610  
**ISSN:** 1871-5206  
(IF 2.556 za 2017, **M22**, Chemistry, Medicinal)

3.4. **Milena D. Vukic**, Nenad L. Vukovic, Ana Obradovic, Milos Matic, Maja Djukic, Edina Avdovic. Redox status, DNA and HAS binding study of naturally occurring naphthoquinone derivatives.  
*Excli Journal*,  
(2020), vol 19, pp 48-70  
**DOI:** <http://dx.doi.org/10.17179/excli2019-1859>  
**ISSN:** 1611-2156  
(IF 2.112 za 2018, **M22**, Biology 31/87)

#### 4. Радови у међународним часописима (M23)

4.1. Nenad Vukovic, **Milena Vukic**, Gorica Djelic, Jana Hutkova and Miroslava Kacaniova, Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Various Plant Organs of Wild Growing *Nepeta cataria* from Serbia.  
*Journal of Essential Oil Bearing Plants*  
(2016) vol. 19, No 4,  
**DOI:** 10.1080/0972060X.2016.1211965  
**ISSN:** 0972-060X  
(IF 0.439 za 2016, **M23**, Plant Sciences 183/211)

4.2. Danijela Stojković, Alessia Bacchi, Davide Capucci, Milica R Milenković, Božidar Čobeljić, Srećko Trifunović, Katarina Anđelković, Verica V Jevtić, Nenad Vuković, **Milena Vukić**, Dušan Sladić,  
Synthesis and characterization of palladium(II) complexes with glycine coumarin derivatives.  
*Journal of Serbian Chemical Society*  
(2016) vol 81, No 12, 1383–1392,  
**DOI:** 10.2298/JSC160915087S  
**ISSN:** 0352-5139  
(IF 0.970 za 2016, **M23**, Chemistry, Multidisciplinary, 131/166)

4.3. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. Vuković, **M. Vukić**, I. Potočňák, I. R. Zelen, M. M. Zarić, M. M. Mišić, D. Baskić, G. N. Kaluđerović, S. R. Trifunović,  
Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex with a coumarin-valine derivate.  
*Journal of Structural Chemistry*  
(2017) vol. 58, No. 3, 550-557;  
**DOI:** 10.1134/S0022476617030179  
**ISSN:** 0022-2860  
(IF 0.472 za 2017, **M23**, Chemistry, Physical, 46/46)

4.4. Danijela Lj Stojković, Verica V. Jevtić, Nenad Vuković, Milena Vukić, Petar Čanović, Milan M. Zarić, Milena M. Mišić, Dragče M. Radovanović, Dejan Baskić, Srećko R. Trifunović,  
Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives.  
*Journal of Molecular Structure*  
(2018) vol. 1157, 425-433;  
**DOI:** 10.1016/j.molstruc.2017.12.095  
**ISSN:** 1573-8779  
(IF 1.753 za 2017, **M23**, Chemistry, Inorganic & Nuclear, 91/146)

## 5. Радови у врхунским часописима националног значаја (M51)

5.1. Nenad L. Vuković, Milena D. Vukić, Gorica T. Đelić, Miroslava M. Kacaniova, Mirjana Cvijović, The investigation of bioactive secondary metabolites of the methanolic extract of *Eryngium amethystinum*  
*Kragujevac Journal of Science*  
(2018) vol. 40, 113-129;  
**DOI:** 10.5937/KgJSci1840113V  
**ISSN:** 1450-9636

## 6. Радови у националним часописима (M53)

6.1. Ghania Benaiche, Nouredine Belattar, Srećko Trifunović, Nenad Vuković, D. Todorović, Milos Todorović, Dejan Baskic and **Milena Vukic**,  
Isolation of Alkaloids and Anti-tumor Activity of the Crude Methanolic Extract of Algerian *Cytisus purgans*.  
*Oriental journal of chemistry*  
(2015) vol. 31, No. 4, 1943-1948;  
**DOI:** 10.13005/ojc/310411  
**ISSN:** 0970-020 X

## 7. Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

7.1. N. Vuković, **M. Vukić**, **D. Stojković**, V. Jevtić and Miroslava Kacainova,  
Seasonal variation in chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of various plant organs of wild growing *Nepeta cataria* from Serbia. 11th International Scientific Conference of Biotechnology and quality of raw materials and foodstuffs, Nitra, Slovakia, 2016, p. 79; **ISBN: 978-80-552-1452-8**

- 7.2. Srećko R. Trifunović, Nenad Vuković, **Milena D. Vukić**, Danijela Lj. Stojković, Dragoslav R. Ilić, Miroslava Kacainova, Antibacterial activity of structurally modified butyrolactones with amino acids. International Scientific Symposium Bioengineering of animal resources 2016, Temišvar, Rumunija, 2016, p. 48; **ISSN: 2501-725X; ISSN-L: 2501725X**
- 7.3. **Vukić Milena**, Obradović Ana, Kacainova Miroslava, Vuković Nenad, Marković Snežana, *Eryngium serbicum* as new source of cytotoxic and antibacterial agents. Serbian Biochemical Society, Sixth Conference. Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of Field, 18. november, Belgrade, Serbia, proceedings, 2016., p.161-163. **ISBN: 978-86-7220-081-2**
- 7.4. **Milena Vukić**, Ana Obradović, Miloš Matić, Nenad Vuković, Prooxidative effects of shikonin derivatives in human breast cancer cell line MDA-MB-231. Serbian Biochemical Society, Eighth Conference. Novi Sad, 2018., p.195-196. **ISBN: 978-86-7220-096-6**
- 7.5. **Milena Dejan Vukić**, Nenad Vukovic, Dejan Baskic, Miroslava Kacainova. Examination of Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Naphthoquinone Rich Extracts from the Roots of *Onosma visianii* Clem. 1st Molecules Medicinal Chemistry Symposium. Emerging Drug Discovery Approaches against Infectious Diseases. Barcelona, Spain, 8 September 2017. Book of abstract p 96
- 7.6. **Milena Vukic**, Ana Obradovic, Milos Matic, Edina Avdovic, Nenad Vukovic. Prooxidative effects, DNA and HSA binding of naphthoquinone derivatives. 6<sup>th</sup> EFMC Young Medicinal Chemist Symposium. Athens, Greece – September 5-6, 2019. Book of abstract. P097, p 138.
- 8. Саопштења на националним научним конференцијама штампана у изводу (M64)**
- 8.1. Gordana P. Radić, Davide Capucci, Alessia Bacchi, Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Nenad Vuković, **Milena Vukić**, Katarina Anđelković, Srećko R. Trifunović, Synthesis and crystal structure of palladium (II) complex with methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)acetate. 22nd Conference of the serbian crystallographic society, Smederevo, Srbija, 2015, p. 43. **ISBN: 978-86-912959-2-9**
- 8.2. Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Nenad Vuković, **Milena Vukić**, Gordana P. Radić, Ivan Potočnak, Srećko R. Trifunović, Synthesis and crystal structure of 2-acetylbutyrolactone with methyl ester of l-tyrosine. 22nd Conference of the serbian crystallographic society, Smederevo, Srbija, 2015, p. 43. **ISBN: 978-86-912959-2-9**
- 8.3. D. Stojković, V. Jevtić, S. Trifunović, N. Vuković, **M. Vukić**, I. Potočnak, E. Avdović, S. Jovičić,

Synthesis and crystal structure of 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione. 23rd Conference of the Serbian Crystallographic society, Andrevlje, 2016., p.85. **ISBN: 978-86-912959-3-6**

8.4.D. Stojković, V. Jevtić, S. Trifunović, N. Vuković, **M. Vukić**, O. Klisurić, E. Avdović, S. Jovičić,

Synthesis and crystal structure of methyl ester of phenylalanine ammonium-thiocyanate. 24th Conference of the Serbian Crystallographic society, Vranje, 2017., p.27; 43. **ISBN: 978-86-912959-3-6**

8.5. E. H. Avdović, V. V. Jevtić, N. Vuković, **M. Vukić**, Z. Marković, I. Potočnjak, S. R. Trifunović,

Synthesis and crystal structure of 3-(1-O-toluidine-ethylidene)-chroman-2,4-dione. 24th Conference of the Serbian Crystallographic society, Vranje, 2017., p.31. **ISBN: 978-86-912959-3-6**

8.6. **Milena D. Vukić**, Nenad L. Vuković, Danijela Lj. Stojković, Srećko R. Trifunović, Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from *Onosma visianii* Clem. Fourth conference of young chemists of Serbia, Beograd, Srbija, 2016, p. 67. **ISBN: 978-86-7132-064-1**

8.7. Filip Vukajlović, Nenad Vuković, **Milena Vukić**, Snežana Pešić. Odrambeni sekretari vrste *Meloe proscarabaeus* Linnaeus, 1758 (Coleoptera, Meloidae). Rezimeji X Simpozijuma entomologa Srbije 2015., pp 39;

8.8. **M. Vukić**, N. Vuković, V. Tešević, G. Krstić, P. Vulić. Synthesis and characterization of inclusion complex of acetyl shikonin and  $\beta$ -cyclodextrin. 25<sup>th</sup> Conference of the Serbian Crystallographic society, Bajina Bašta, 2018., p. 50. **ISBN: 978-86-912959-4-3**

8.9. Marina Radović Jakovljević, Aleksandra Marković, Jovana Tubić, Darko Grujičić, Milan Stanković, Nenad Vuković, **Milena Vukić**, Milena Milutinović, Olivera Milošević-Djordjević. Cytotoxic and genotoxic properties of plant *Artemisia vulgaris*. 6th Congress of the Serbian genetic society, Vrnjačka Banja, 2019., p.123. **ISBN: 978-86-87109-15-5**

## 9. Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33)

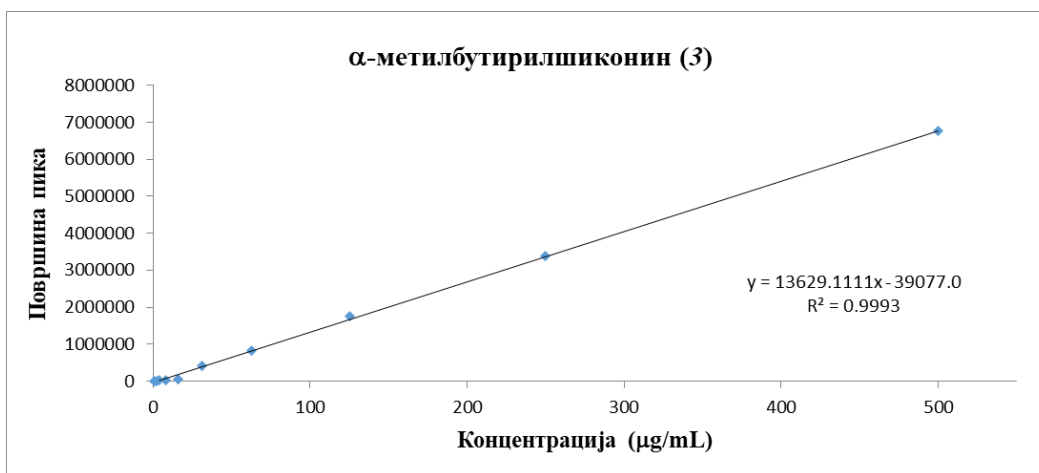
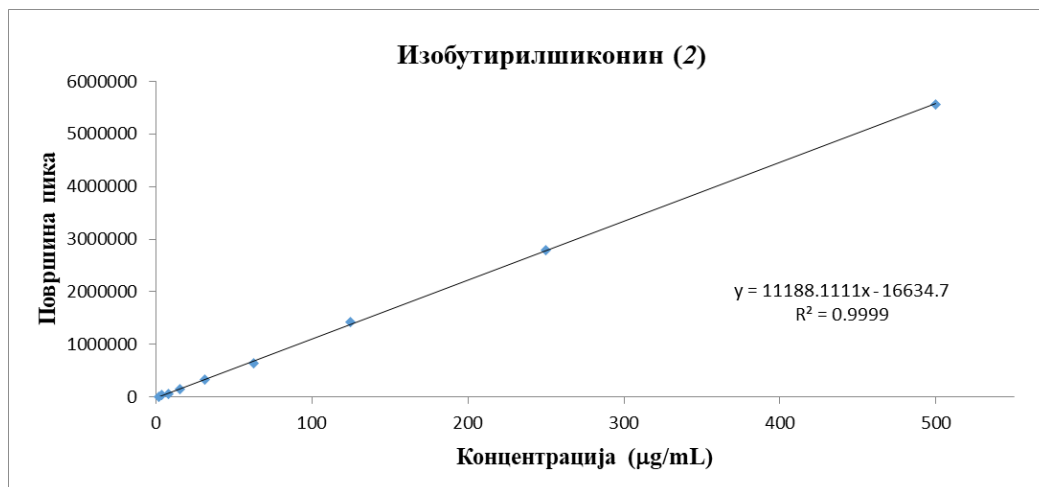
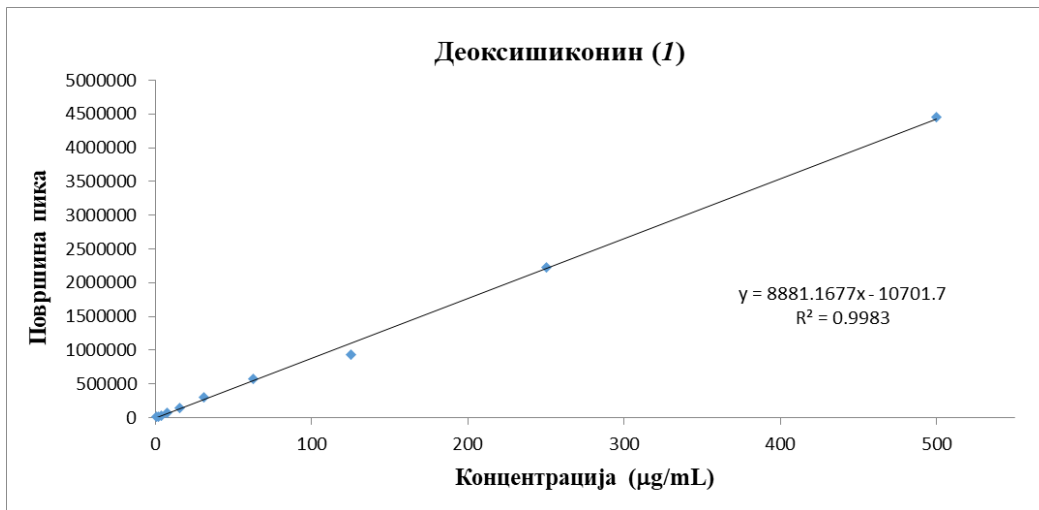
9.1. Milenković, Dejan, Trifunović, Srećko, Avdović, Edina; Vuković, Nenad; **Vukić, Milena**; Dimitrić-Marković, Jasmina; Marković, Zoran. Experimental and theoretical study of the UV-Vis spectrum of a new coumarine-derived ligand. 2<sup>nd</sup> EAI International Conference on Future Access Enablers of Ubiquitous and Intelligent Infrastructures (Fabulous 2016), Belgrade 2016

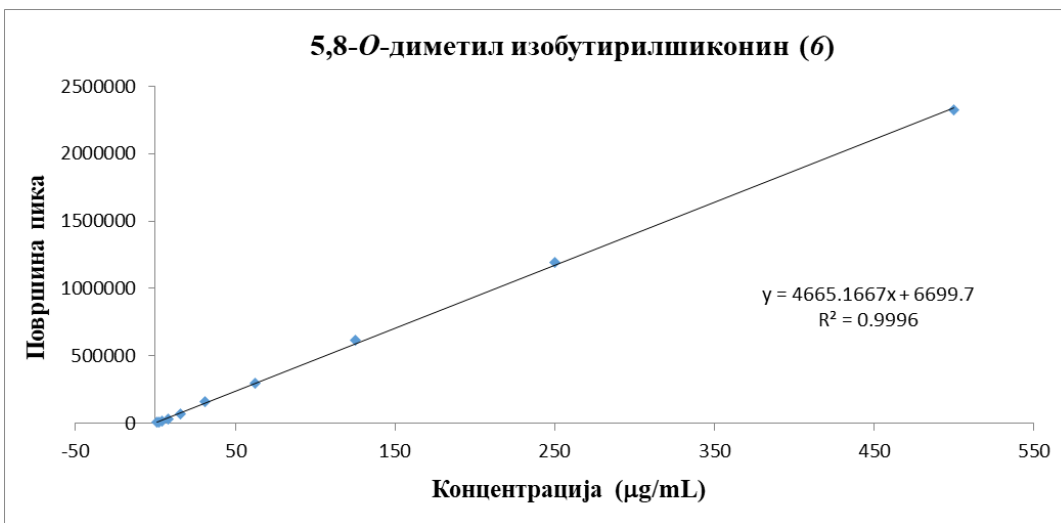
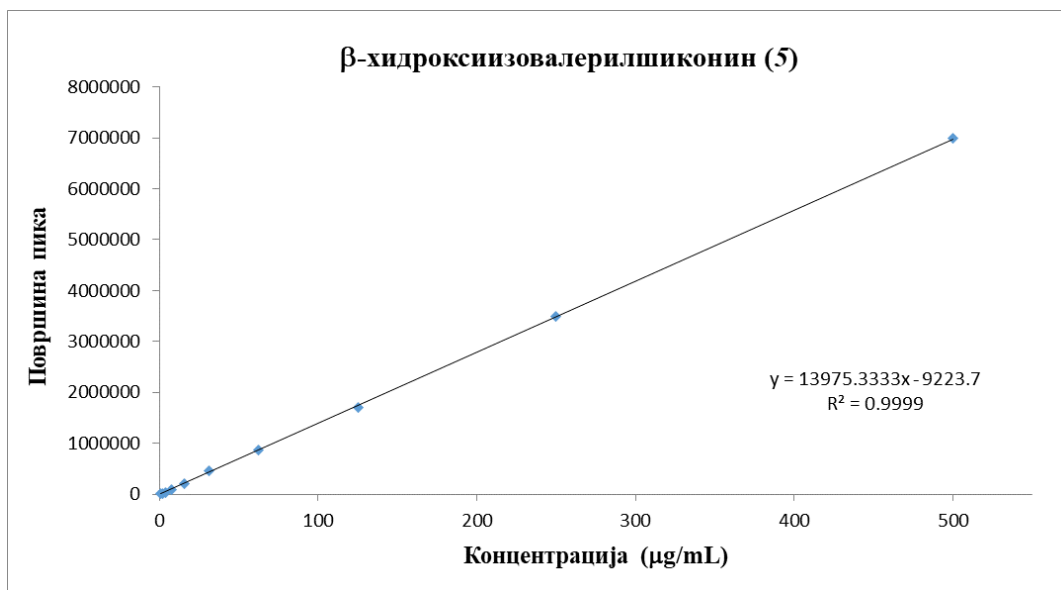
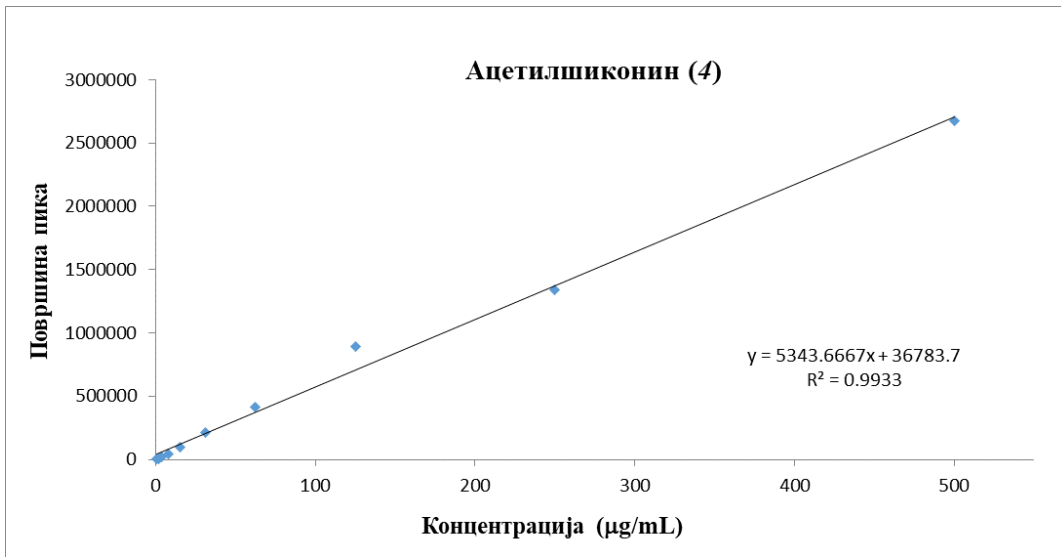


*Прилог*

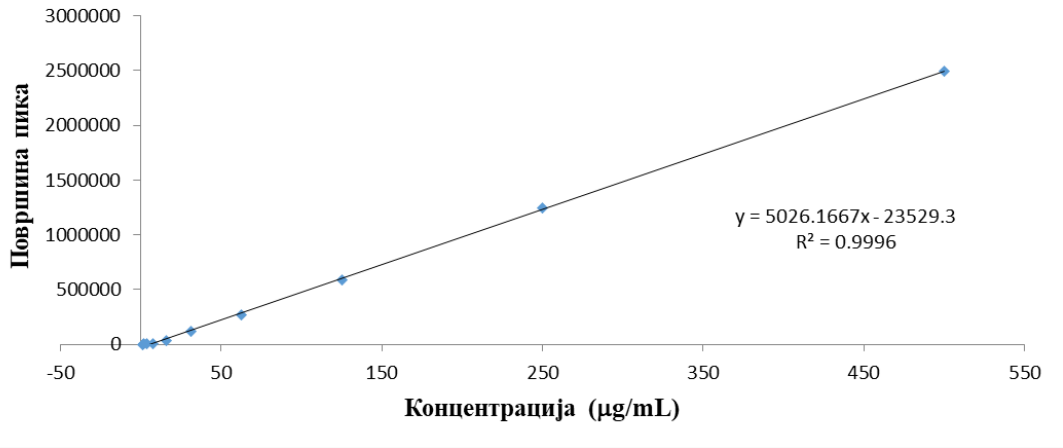


Слика III. Калибрационе криве које показују линеарну зависност површине одговарајућег пика од концентрације једињења.





**5,8-*O*-диметил деоксишиконин (7)**



**Табела III.** Ефекти изолованих нафтохинона (**3**, **4** и **5**) на продукцију супероксид анион радикала ( $O_2^-$ ) у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама након третмана од 24 h, 48 h and 72 h у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола). Резултати су приказани као концентрације у pmol/mL.

Концентрација нафтохинона ( $\mu$ M)	Концентрација ( $\mu$ mol/mL)					
	НСТ-116			МДА-МВ-231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>3</b>						
0	24,72 $\pm$ 0,45	32,62 $\pm$ 1,04	48,84 $\pm$ 1,62	84,20 $\pm$ 0,51	89,14 $\pm$ 0,29	133,63 $\pm$ 0,90
0,1	27,97 $\pm$ 1,43	84,72 $\pm$ 3,20*	84,08 $\pm$ 1,26*	89,47 $\pm$ 0,34*	89,34 $\pm$ 0,45	139,32 $\pm$ 2,91
1	28,96 $\pm$ 0,42*	77,91 $\pm$ 1,34*	118,88 $\pm$ 0,73*	88,79 $\pm$ 1,73*	90,00 $\pm$ 2,82	141,59 $\pm$ 3,55
10	33,23 $\pm$ 0,64*	65,04 $\pm$ 4,16*	120,31 $\pm$ 1,63*	88,14 $\pm$ 0,68*	88,16 $\pm$ 0,75	143,88 $\pm$ 4,47*
50	33,88 $\pm$ 0,80*	56,57 $\pm$ 2,22*	130,84 $\pm$ 4,06*	86,77 $\pm$ 0,56*	89,06 $\pm$ 2,62	151,57 $\pm$ 0,50*
100	35,35 $\pm$ 1,05*	50,86 $\pm$ 3,25*	153,95 $\pm$ 0,51*	84,77 $\pm$ 0,74	93,98 $\pm$ 2,16	155,38 $\pm$ 0,97*
<b>4</b>						
0	24,72 $\pm$ 0,45	32,62 $\pm$ 1,04	48,84 $\pm$ 1,62	84,20 $\pm$ 0,51	89,14 $\pm$ 0,29	133,63 $\pm$ 0,90
0,1	25,70 $\pm$ 0,53	74,41 $\pm$ 0,67*	49,24 $\pm$ 1,04	88,88 $\pm$ 0,66*	89,82 $\pm$ 1,53	138,80 $\pm$ 2,94
1	29,66 $\pm$ 0,84*	67,81 $\pm$ 2,46*	56,75 $\pm$ 4,33	88,36 $\pm$ 1,38*	90,02 $\pm$ 2,30	144,68 $\pm$ 2,87*
10	31,04 $\pm$ 1,64*	64,46 $\pm$ 7,02*	100,14 $\pm$ 4,98*	87,37 $\pm$ 1,25*	91,14 $\pm$ 1,21	149,48 $\pm$ 3,68*
50	32,37 $\pm$ 0,67*	50,17 $\pm$ 2,78*	112,33 $\pm$ 0,43*	86,95 $\pm$ 0,60*	91,72 $\pm$ 2,86	151,70 $\pm$ 2,41*
100	33,08 $\pm$ 1,05*	37,21 $\pm$ 0,84*	113,02 $\pm$ 0,51*	85,13 $\pm$ 1,06	95,27 $\pm$ 3,13	163,65 $\pm$ 2,95*
<b>5</b>						
0	24,72 $\pm$ 0,45	32,62 $\pm$ 1,04	48,84 $\pm$ 1,62	84,20 $\pm$ 0,51	89,14 $\pm$ 0,29	133,63 $\pm$ 0,90
0,1	29,05 $\pm$ 0,49*	76,49 $\pm$ 4,23*	49,52 $\pm$ 2,90	87,35 $\pm$ 0,88*	89,93 $\pm$ 1,75	135,77 $\pm$ 3,20
1	29,47 $\pm$ 0,73*	74,26 $\pm$ 2,32*	83,63 $\pm$ 3,34*	86,25 $\pm$ 0,94	90,99 $\pm$ 1,98	143,55 $\pm$ 4,69
10	30,76 $\pm$ 0,76*	70,65 $\pm$ 2,26*	109,96 $\pm$ 7,28*	85,83 $\pm$ 0,48	91,10 $\pm$ 2,90	144,83 $\pm$ 5,98
50	34,37 $\pm$ 0,61*	58,86 $\pm$ 5,28*	112,51 $\pm$ 1,48*	84,93 $\pm$ 0,57	92,40 $\pm$ 0,88*	152,64 $\pm$ 7,72*
100	36,36 $\pm$ 0,55*	39,41 $\pm$ 0,90*	113,85 $\pm$ 5,97*	84,56 $\pm$ 1,02	95,15 $\pm$ 0,58*	156,01 $\pm$ 3,41*

Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SE од три експеримента, \* $p < 0,05$

**Табела П2.** Ефекти изолованих нафтохинона (**3**, **4** и **5**) на продукцију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама након третмана од 24 h, 48 h and 72 h у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола). Резултати су приказани као концентрације у nmol/mL.

Концентрација нафтохинона ( $\mu\text{M}$ )	Концентрација (nmol/mL)					
	НСТ-116			МДА-МВ-231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>3</b>						
0	8,87±0,15	13,81±0,44	14,31±0,43	16,00±0,54	17,79±0,63	20,07±0,67
0,1	10,05±0,29*	14,63±0,75	15,42±0,25*	16,50±0,33	17,06±0,61	20,38±0,91
1	10,65±0,53*	16,16±0,82*	15,28±0,17	17,61±1,50	19,87±2,01	20,75±0,47
10	10,99±0,48*	17,38±0,44*	15,44±0,46	19,02±0,69*	23,56±1,00*	21,62±0,89
50	13,68±0,41*	19,50±0,41*	16,30±0,45*	19,71±0,58*	22,72±0,94*	28,91±1,09*
100	14,75±0,30*	19,72±0,56*	17,06±0,22*	27,45±0,76*	25,18±1,64*	31,55±0,64*
<b>4</b>						
0	8,87±0,15	13,81±0,44	14,31±0,43	16,00±0,54	17,79±0,63	20,07±0,67
0,1	9,04±0,42	20,42±0,61*	14,56±0,46	17,80±0,81*	16,91±0,66	20,60±0,11
1	9,60±0,24*	21,86±0,83*	15,32±0,37	21,34±0,68*	21,61±1,27*	21,05±0,27
10	12,21±0,24*	24,85±1,23*	15,13±0,40	21,30±0,92*	27,38±0,84*	21,27±0,29
50	16,27±0,45*	28,25±0,84*	17,35±0,49*	26,49±0,76*	31,78±0,80*	21,45±0,50
100	27,57±0,49*	34,79±0,63*	28,82±0,34*	42,99±0,54*	54,24±1,95*	24,28±0,63*
<b>5</b>						
0	8,87±0,15	13,81±0,44	14,31±0,43	16,00±0,54	17,79±0,63	20,07±0,67
0,1	10,04±0,43	15,66±0,41*	14,45±0,33	16,03±0,90	21,16±1,23*	20,51±0,61
1	10,24±0,58*	16,12±0,40*	14,44±0,49	18,01±0,74*	24,04±0,82*	22,23±1,80
10	11,33±0,37*	22,68±1,00*	14,64±0,54	18,12±1,34	25,15±0,87*	24,57±1,15*
50	20,13±0,93*	26,90±0,68*	22,77±0,54*	25,64±0,90*	31,47±0,86*	34,56±1,28*
100	24,93±0,43*	30,44±0,65*	33,77±0,43*	33,21±0,92*	67,16±1,89*	46,91±1,45*

Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SE од три експеримента, \* $p < 0,05$

**Табела ПЗ.** Ефекти изолованих нафтохинона (**3**, **4** и **5**) на концентрацију редукованог глутатиона (GSH) у НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама након третмана од 24 h, 48 h and 72 h у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола). Резултати су приказани као концентрације у  $\mu\text{mol/mL}$ .

Концентрација нафтохинона ( $\mu\text{M}$ )	Концентрација ( $\mu\text{mol/mL}$ )					
	НСТ-116			МДА-МВ-231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>3</b>						
0	92,63 $\pm$ 1,77	165,18 $\pm$ 0,95	171,83 $\pm$ 0,94	146,65 $\pm$ 1,59	148,99 $\pm$ 2,11	177,61 $\pm$ 1,91
0,1	122,66 $\pm$ 1,52*	176,99 $\pm$ 1,32*	217,19 $\pm$ 2,09*	157,20 $\pm$ 1,65*	162,78 $\pm$ 2,23*	201,33 $\pm$ 2,26*
1	108,29 $\pm$ 1,85*	168,24 $\pm$ 1,73	204,30 $\pm$ 1,94*	155,46 $\pm$ 1,55*	160,24 $\pm$ 2,24*	197,48 $\pm$ 2,26*
10	105,85 $\pm$ 2,72*	167,52 $\pm$ 2,27	193,66 $\pm$ 2,09*	155,26 $\pm$ 2,27*	157,49 $\pm$ 1,83*	193,42 $\pm$ 1,62*
50	103,99 $\pm$ 1,91*	166,81 $\pm$ 2,68	178,51 $\pm$ 2,56	153,88 $\pm$ 1,00*	152,88 $\pm$ 1,79	187,95 $\pm$ 1,44*
100	98,07 $\pm$ 1,81*	165,20 $\pm$ 1,57	173,14 $\pm$ 1,60	148,25 $\pm$ 3,20	152,29 $\pm$ 2,02	178,87 $\pm$ 3,06
<b>4</b>						
0	92,63 $\pm$ 1,77	165,18 $\pm$ 0,95	171,83 $\pm$ 0,94	146,65 $\pm$ 1,59	148,99 $\pm$ 2,11	177,61 $\pm$ 1,91
0,1	111,78 $\pm$ 3,81*	182,73 $\pm$ 2,66*	182,19 $\pm$ 1,86*	162,83 $\pm$ 2,05*	163,24 $\pm$ 1,67*	186,81 $\pm$ 2,54*
1	107,77 $\pm$ 1,43*	180,66 $\pm$ 4,36*	176,95 $\pm$ 2,04*	159,75 $\pm$ 1,53*	161,25 $\pm$ 1,12*	181,51 $\pm$ 1,82
10	98,62 $\pm$ 1,60	173,69 $\pm$ 2,07*	175,35 $\pm$ 1,72	158,37 $\pm$ 1,05*	158,58 $\pm$ 0,98*	180,55 $\pm$ 2,01
50	96,46 $\pm$ 2,27*	167,10 $\pm$ 1,22	173,45 $\pm$ 1,17	151,24 $\pm$ 1,63	152,43 $\pm$ 3,02	179,27 $\pm$ 1,97
100	94,66 $\pm$ 1,48	166,52 $\pm$ 2,05	171,89 $\pm$ 1,59	147,62 $\pm$ 2,40	152,79 $\pm$ 1,35	178,01 $\pm$ 2,00
<b>5</b>						
0	92,63 $\pm$ 1,77	165,18 $\pm$ 0,95	171,83 $\pm$ 0,94	146,65 $\pm$ 1,59	148,99 $\pm$ 2,11	177,61 $\pm$ 1,91
0,1	102,18 $\pm$ 0,75*	180,90 $\pm$ 2,59*	205,03 $\pm$ 6,26*	167,99 $\pm$ 1,50*	171,12 $\pm$ 3,00*	203,32 $\pm$ 2,40*
1	97,96 $\pm$ 1,30*	176,90 $\pm$ 2,20*	196,55 $\pm$ 3,00*	160,39 $\pm$ 1,23*	169,48 $\pm$ 2,48*	193,66 $\pm$ 1,40*
10	97,83 $\pm$ 1,04*	174,40 $\pm$ 0,58*	187,82 $\pm$ 4,02*	158,35 $\pm$ 2,03*	162,91 $\pm$ 1,56*	191,39 $\pm$ 4,74*
50	95,71 $\pm$ 1,08	167,46 $\pm$ 1,86	173,65 $\pm$ 2,21	151,27 $\pm$ 1,56	154,23 $\pm$ 1,16*	181,10 $\pm$ 1,96
100	95,30 $\pm$ 0,53	165,64 $\pm$ 1,65	173,48 $\pm$ 1,52	148,14 $\pm$ 1,98	152,85 $\pm$ 1,63	178,46 $\pm$ 2,21

Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SE од три експеримента, \* $p < 0,05$

**Табела П4.** Ефекти изолованих нафтохинона (**3**, **4** и **5**) на концентрацију оксидованог глутатиона (GSSG) у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама након третмана од 24 h, 48 h and 72 h у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола). Резултати су приказани као концентрације у  $\mu\text{mol/mL}$ .

Концентрација нафтохинона ( $\mu\text{M}$ )	Концентрација ( $\mu\text{mol/mL}$ )					
	НСТ-116			MDA-MB-231		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>3</b>						
0	24,72 $\pm$ 0,45	32,62 $\pm$ 1,04	48,84 $\pm$ 1,62	84,20 $\pm$ 0,51	89,14 $\pm$ 0,29	133,63 $\pm$ 0,90
0,1	27,97 $\pm$ 1,43	84,72 $\pm$ 3,20*	84,08 $\pm$ 1,26*	89,47 $\pm$ 0,34*	89,34 $\pm$ 0,45	139,32 $\pm$ 2,91
1	28,96 $\pm$ 0,42*	77,91 $\pm$ 1,34*	118,88 $\pm$ 0,73*	88,79 $\pm$ 1,73*	90,00 $\pm$ 2,82	141,59 $\pm$ 3,55
10	33,23 $\pm$ 0,64*	65,04 $\pm$ 4,16*	120,31 $\pm$ 1,63*	88,14 $\pm$ 0,68*	88,16 $\pm$ 0,75	143,88 $\pm$ 4,47*
50	33,88 $\pm$ 0,80*	56,57 $\pm$ 2,22*	130,84 $\pm$ 4,06*	86,77 $\pm$ 0,56*	89,06 $\pm$ 2,62	151,57 $\pm$ 0,50*
100	35,35 $\pm$ 1,05*	50,86 $\pm$ 3,25*	153,95 $\pm$ 0,51*	84,77 $\pm$ 0,74	93,98 $\pm$ 2,16	155,38 $\pm$ 0,97*
<b>4</b>						
0	24,72 $\pm$ 0,45	32,62 $\pm$ 1,04	48,84 $\pm$ 1,62	84,20 $\pm$ 0,51	89,14 $\pm$ 0,29	133,63 $\pm$ 0,90
0,1	25,70 $\pm$ 0,53	74,41 $\pm$ 0,67*	49,24 $\pm$ 1,04	88,88 $\pm$ 0,66*	89,82 $\pm$ 1,53	138,80 $\pm$ 2,94
1	29,66 $\pm$ 0,84*	67,81 $\pm$ 2,46*	56,75 $\pm$ 4,33	88,36 $\pm$ 1,38*	90,02 $\pm$ 2,30	144,68 $\pm$ 2,87*
10	31,04 $\pm$ 1,64*	64,46 $\pm$ 7,02*	100,14 $\pm$ 4,98*	87,37 $\pm$ 1,25*	91,14 $\pm$ 1,21	149,48 $\pm$ 3,68*
50	32,37 $\pm$ 0,67*	50,17 $\pm$ 2,78*	112,33 $\pm$ 0,43*	86,95 $\pm$ 0,60*	91,72 $\pm$ 2,86	151,70 $\pm$ 2,41*
100	33,08 $\pm$ 1,05*	37,21 $\pm$ 0,84*	113,02 $\pm$ 0,51*	85,13 $\pm$ 1,06	95,27 $\pm$ 3,13	163,65 $\pm$ 2,95*
<b>5</b>						
0	24,72 $\pm$ 0,45	32,62 $\pm$ 1,04	48,84 $\pm$ 1,62	84,20 $\pm$ 0,51	89,14 $\pm$ 0,29	133,63 $\pm$ 0,90
0,1	29,05 $\pm$ 0,49*	76,49 $\pm$ 4,23*	49,52 $\pm$ 2,90	87,35 $\pm$ 0,88*	89,93 $\pm$ 1,75	135,77 $\pm$ 3,20
1	29,47 $\pm$ 0,73*	74,26 $\pm$ 2,32*	83,63 $\pm$ 3,34*	86,25 $\pm$ 0,94	90,99 $\pm$ 1,98	143,55 $\pm$ 4,69
10	30,76 $\pm$ 0,76*	70,65 $\pm$ 2,26*	109,96 $\pm$ 7,28*	85,83 $\pm$ 0,48	91,10 $\pm$ 2,90	144,83 $\pm$ 5,98
50	34,37 $\pm$ 0,61*	58,86 $\pm$ 5,28*	112,51 $\pm$ 1,48*	84,93 $\pm$ 0,57	92,40 $\pm$ 0,88*	152,64 $\pm$ 7,72*
100	36,36 $\pm$ 0,55*	39,41 $\pm$ 0,90*	113,85 $\pm$ 5,97*	84,56 $\pm$ 1,02	95,15 $\pm$ 0,58*	156,01 $\pm$ 3,41*

Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  SE од три експеримента, \* $p < 0,05$

**Табела П5.** Резултати докинг анализе тестираних нафтохинона 3, 4 и 5 са молекулом ДНК. Одговарајуће пуринске базе и њихове позиције у структури молекула ДНК, типови интеракција у току формирања веза, дужине веза у Å између активних центара нафтохинона и пуринских база, енергије интеракција ( $E_i$ ) у kJ/mol, енергија везивања ( $\Delta G_{bind}$ ) у kJ/mol, константа инхибиције ( $K_i$ ) у  $\mu M$ .

Комплекс	Интеракција	Тип интеракције	Дужина везе (Å)	$E_i$ (kJ/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kJ/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )
<b>3-ДНК</b>	DA5:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,08	-0,60	<b>-22,99</b>	<b>93,14</b>
	DA6:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	1,87	-0,60		
	DA17:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	3,03	-0,05		
	DA16:C -LIG:O	Угљеник-водоник веза	3,39	-0,03		
	DA17:C-LIG:O	Угљеник-водоник веза	2,04	-0,03		
	DA18:H-LIG	Pi-донор водонична веза	2,05	-0,09		
	DA18 -LIG	Pi-Pi Т-облик	5,93	-0,01		
	DA18 -LIG	Pi-Pi Т-облик	5,35	-0,01		
	DT19 -LIG	Pi-Pi Т-облик	5,54	-0,01		
	DA5-LIG	Pi-алкил	4,13	-0,02		
	DA6-LIG	Pi-алкил	4,84	-0,02		
	DA16-LIG	Pi-алкил	4,54	-0,02		
<b>4-ДНК</b>	DA5:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,56	-0,20	<b>-20,98</b>	<b>209,04</b>
	DA5:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,15	-0,60		
	DA18:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,65	-0,20		
	DA18:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	1,84	-0,60		
	DT19 - LIG	Pi-Pi Т-облик	5,73	-0,01		
	DT19 - LIG	Pi-Pi Т- облик	5,90	-0,01		
	DA16 - LIG	Pi-алкил	4,02	-0,02		
DA17 - LIG	Pi-алкил	4,52	-0,02			
<b>5-ДНК</b>	DA5:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	1,82	-0,60	<b>-20,31</b>	<b>274,69</b>
	DA6:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,19	-0,60		
	DA6:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,25	-0,60		
	DA17:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,93	-0,07		
	DA17:H-LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,03	-0,60		
	DA18:H- LIG:O	Конвенционална водонична веза	1,92	-0,60		
	LIG:H - DT7:O4	Конвенционална водонична веза	2,20	-0,60		
	DT19 - LIG	Pi-Pi Т-облик	5,55	-0,01		
	DA16 - LIG	Pi-алкил	4,17	-0,02		



**Табела П6.** Резултати докинг анализе тестираних нафтохинона 3, 4 и 5 са молекулом HSA. Одговарајуће аминокиселине и њихове позиције у структури протеина HSA, типови интеракција у току формирања веза, дужине веза у Å између активних центара нафтохинона и аминокиселина, енергије интеракција ( $E_i$ ) у kJ/mol, енергија везивања ( $\Delta G_{bind}$ ) у kJ/mol, константа инхибиције ( $K_i$ ) у  $\mu M$ .

Комплекс	Интеракција	Тип интеракције	Дужина везе (Å)	$E_i$ (kJ/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kJ/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )
3-HSA	LYS199:H - LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,35	-2,00	<b>-13,17</b>	<b>4,91</b>
	ARG222:H - LIG:O	Конвенционална водонична веза	3,01	-0,21		
	ARG257:H - LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,61	-0,08		
	LIG:H - GLU153:O	Конвенционална водонична веза	2,05	-2,51		
	LYS195:N - LIG	Pi-катјон	4,22	-0,08		
	LYS195:N - LIG	Pi-катјон	4,11	-0,08		
	ALA291:C - LIG	Pi-сигма	3,33	-0,17		
	ALA291 - LIG:C	Алкил	3,74	-0,08		
	LIG:C - ARG257	Алкил	3,85	-0,08		
	LIG:C - LEU260	Алкил	4,34	-0,08		
	LIG:C - ARG218	Алкил	3,84	-0,08		
	LIG:C - ARG218	Алкил	4,67	-0,08		
	TRP214 - LIG1:C	Pi-алкил	4,47	-0,08		
	LIG - LYS195	Pi-алкил	4,96	-0,08		
LIG - ALA291	Pi-алкил	4,43	-0,08			
4-HSA	ARG222:H - LIG:O	Конвенционална водонична веза	2,24	-2,14	<b>-29,08</b>	<b>8,08</b>
	LIG:H - LYS195:O	Конвенционална водонична веза	2,57	-1,13		
	TRP214 - LIG	Pi-Pi Stacked	4,32	-0,08		
	TRP214 - LIG	Pi-Pi Stacked	5,24	-0,04		
	TRP214 - LIG	Pi-Pi Stacked	4,03	-0,08		
	TRP214 - LIG	Pi-Pi Stacked	3,90	-0,08		
	LIG:C - ARG218	Алкил	3,97	-0,08		
	LIG:C - LEU238	Алкил	4,38	-0,08		
	LIG:C - LEU219	Алкил	4,21	-0,08		
	LIG - LYS199	Pi-алкил	3,74	-0,08		
	LIG - LYS199	Pi-алкил	4,44	-0,08		
5-HSA	LIG:H - GLU292:O	Конвенционална водонична веза	1,93	-2,51	<b>-7,74</b>	<b>44,21</b>
	LIG:H - ASP451:O	Конвенционална водонична веза	1,97	-2,51		
	ALA191:C - LIG	Pi-сигма	3,71	-0,08		
	ALA191:C - LIG	Pi-сигма	3,28	-0,08		
	TYR452 - LIG	Pi-Pi T-облик	4,40	-0,08		
	ALA191 - LIG:C	Алкил	3,47	-0,08		



*Публиковани  
радови*

## Original article:

# ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF NAPHTHO- QUINONE PIGMENTS FROM *ONOSMA VISIANII* CLEM

Milena D. Vukic<sup>1</sup>, Nenad L. Vukovic<sup>1\*</sup>, Gorica T. Djelic<sup>2</sup>, Suzana Lj. Popovic<sup>3</sup>, Milan M. Zanic<sup>4</sup>, Dejan D. Baskic<sup>3</sup>, Gordana B. Krstic<sup>5</sup>, Vele V. Tesevic<sup>5</sup>, Miroslava M. Kacaniova<sup>6</sup>

<sup>1</sup> University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup> University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

<sup>6</sup> University of Agriculture in Nitra, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Nitra, Slovakia

\* Corresponding author: Nenad Vukovic, University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia;  
Tel: +38134336223; Fax: +38134335040; e-mail: nvukovic@kg.ac.rs

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2016-762>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## ABSTRACT

In this study, the antibacterial and cytotoxic activities of isolated compounds from the roots of *Onosma visianii* were investigated. By using different chromatographic techniques and appropriate spectroscopic methods, the seven naphthoquinones were described: deoxyshikonin (**1**), isobutyrylshikonin (**2**),  $\alpha$ -methylbutyrylshikonin (**3**), acetylshikonin (**4**),  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin (**5**), 5,8-*O*-dimethyl isobutyrylshikonin (**6**) and 5,8-*O*-dimethyl deoxyshikonin (**7**). Among the tested compounds, **3** and **4** exhibited the highest antibacterial activities toward all tested bacterial species (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for gram positive bacteria: 6.40  $\mu$ g/mL-12.79  $\mu$ g/mL and 6.82  $\mu$ g/mL-13.60  $\mu$ g/mL, respectively; for gram negative bacteria: 4.27  $\mu$ g/mL-8.53  $\mu$ g/mL and 4.77  $\mu$ g/mL-9.54  $\mu$ g/mL, respectively). Also, naphthoquinones **3** and **4** exhibited strong cytotoxic activity against MDA-MB-231 cells (IC<sub>50</sub> values 86.0  $\mu$ g/mL and 80.2  $\mu$ g/mL, respectively), while compounds **1**, **3**, **4** and **5** significantly decreased viability of HCT116 cells (IC<sub>50</sub> values of 97.8  $\mu$ g/mL, 15.2  $\mu$ g/mL, 24.6  $\mu$ g/mL and 30.9  $\mu$ g/mL, respectively). Our results indicated that all tested naphthoquinone pigments are potential candidates for clinical uses as antibacterial and cytotoxic agents.

**Keywords:** *Onosma visianii*, naphthoquinones, antibacterial activity, cytotoxic activity

## INTRODUCTION

The emergence of antibiotic resistance presents one of the most important challenges for the pharmaceutical industry and the

healthcare sector both in the developing and developed countries. The inadequate and excessive use of antibiotics, significantly diminishes the efficacy of current drugs, at the same

SHORT COMMUNICATION



## Naphthoquinone rich *Onosma visianii* Clem (*Boraginaceae*) root extracts induce apoptosis and cell cycle arrest in HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines

Milena D. Vukic<sup>a</sup>, Nenad L. Vukovic<sup>a</sup>, Ana D. Obradovic<sup>b</sup>, Suzana Lj. Popovic<sup>c</sup>, Milan M. Zaric<sup>d</sup>, Predrag M. Djurdjevic<sup>e</sup>, Snezana D. Markovic<sup>b</sup> and Dejan D. Baskic<sup>c,f</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>b</sup>Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>c</sup>Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>d</sup>Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>e</sup>Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>f</sup>Public Health Institute, Kragujevac, Serbia

### ABSTRACT

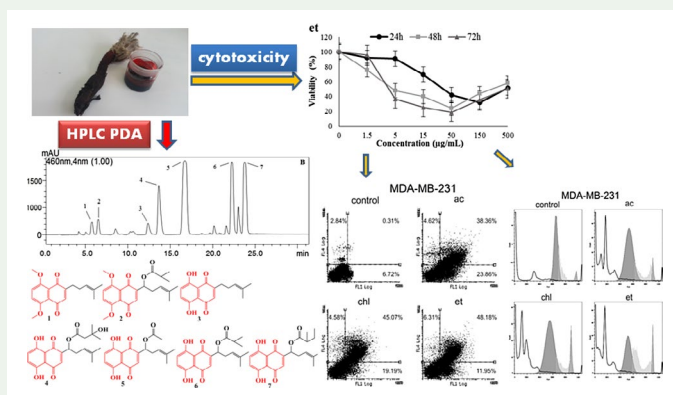
In the present study, five root extracts of *Onosma visianii* Clem were investigated for their *in vitro* cytotoxic activity. On the basis of HPLC-PDA analysis, these extracts have proved to be a rich source of naphthoquinones as natural colourants for food and cosmetic industry. All investigated root extracts contain acetylshikonin, isobutyrylshikonin and  $\alpha$ -methylbutyrylshikonin as major compounds. As the most abundant source of active compounds for antitumour therapy, acetone, chloroform and ethyl acetate extracts showed strong cytotoxic activity towards HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines. Also, these extracts induced apoptosis and cell cycle arrest in HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines.

### ARTICLE HISTORY


Received 11 June 2017  
Accepted 20 August 2017

### KEYWORDS

*Onosma visianii*; HPLC-PDA analysis; naphthoquinone extracts; cytotoxic activity



**CONTACT** Nenad L. Vukovic ✉ nvukovic@kg.ac.rs

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1374271>.

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Original article:

**REDOX STATUS, DNA AND HSA BINDING STUDY OF NATURALLY OCCURRING NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES**

Milena D. Vukic<sup>1</sup>, Nenad L. Vukovic<sup>1,\*</sup>, Ana Obradovic<sup>2</sup>, Milos Matic<sup>2</sup>, Maja Djukic<sup>1</sup>, Edina Avdovic<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Department of Sciences, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

\* **Corresponding author:** Nenad L. Vukovic, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia. Tel: +38134336223; Fax: +38134335040; E-mail: [nvukovic@kg.ac.rs](mailto:nvukovic@kg.ac.rs)

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2019-1859>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**ABSTRACT**

In the present work we modified the procedure for isolation of naphthoquinones  $\alpha$ -methylbutyrylshikon (**1**), acetylshikonin (**2**) and  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin (**3**) from *Onosma visianii* Clem. We also investigated possible mechanisms of **1**, **2** and **3** as antitumor agents. Accordingly, we estimated concentrations of superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), nitrite ( $NO_2^-$ ) and glutathione in HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. Compounds **1** and **3** expressed significant prooxidative activity, while all tested compounds exhibited significant increase in nitrite levels. Also, all examined compounds significantly increased the concentration of oxidized glutathione (GSSG), suggesting significant prooxidative disbalance. The levels of reduced glutathione (GSH) were also elevated as a part of antioxidative cell response. The data indicate that induced oxidative imbalance could be one of the triggers for previously recorded decreased viability of HCT-116 and MDA-MB-231 cells exposed to tested naphthoquinone derivatives. Moreover, we examined interactions mode of compounds **1**, **2** and **3** with CT-DNA as one of the crucial targets of many molecules that express cytotoxic activity. The results obtained by UV-visible, fluorescence and molecular docking study revealed that **1**, **2** and **3** bound to CT-DNA through minor groove binding. Furthermore, the interactions between HSA and **1**, **2** and **3** were examined employing the same methods as for the CT-DNA interaction study. Based on the obtained results, it can be concluded that naphthoquinones **1**, **2** and **3** could be effectively transported by human serum albumin. As a conclusion, this study provides further insight of anti-tumor activity of selected naphthoquinones.

**Keywords:** Naphthoquinone derivatives, redox status, DNA interactions, HSA interactions, colon cancer, breast cancer

**INTRODUCTION**

According to the World Health Organization, cancer is one of the major causes of mortality. Radical approaches as surgery, radiotherapy or chemotherapy are not efficient in

therapy of most cancers. Therefore, discovering novel, effective anticancer drugs is currently in focus of many investigations (Wellington, 2015). The colorectal and breast cancers are among the leading causes of cancer death (Stewart and Wild, 2014). Breast cancer is one of the most common cancer types and





## Original article

Effect of  $\beta$ -cyclodextrin encapsulation on cytotoxic activity of acetylshikonin against HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines

Milena D. Vukic<sup>a</sup>, Nenad L. Vukovic<sup>a,\*</sup>, Suzana Lj. Popovic<sup>b</sup>, Danijela V. Todorovic<sup>c</sup>, Predrag M. Djurdjevic<sup>d</sup>, Sanja D. Matic<sup>e</sup>, Marina M. Mitrovic<sup>f</sup>, Ana M. Popovic<sup>g</sup>, Miroslava M. Kacaniova<sup>h,i</sup>, Dejan D. Baskic<sup>c,j</sup>

<sup>a</sup>University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>d</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>e</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Doctoral Academic Studies, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>f</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>g</sup>Master Academic Studies, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia

<sup>h</sup>Department of Fruit Sciences, Viticulture and Enology, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia

<sup>i</sup>Department of Bioenergy and Food Technology, Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow, Zelwerowicza St. 4, PL-35601 Rzeszow, Poland

<sup>j</sup>Public Health Institute, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 September 2019

Accepted 29 November 2019

Available online 16 December 2019

## Keywords:

Acetylshikonin

$\beta$ -Cyclodextrin

Inclusion complex

Cytotoxicity

## ABSTRACT

Acetylshikonin (AcSh), as a red colored pigment found in roots of the plants from family *Boraginaceae*, showed excellent cytotoxic activity. Due to its hydrophobic nature, and thus poor bioavailability, the aim of this study was to prepare acetylshikonin/ $\beta$ -cyclodextrin (AcSh/ $\beta$ -CD) inclusion complex by using coprecipitation method, characterize obtained system by using UV/VIS, IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, and determine cytotoxic activity. Phase solubility test indicated formation of A<sub>L</sub>-type binary system (substrate/ligand ratio was 1:1 M/M), with stability constant K<sub>s</sub> of 306.01 M<sup>-1</sup>. Formation of noncovalent bonds between inner layer of the hole of  $\beta$ -CD and AcSh was observed using spectroscopic methods. Notable changes in chemical shifts of two protons (−0.020 ppm) from naphthoquinone moiety (C<sub>6</sub>-H and C<sub>7</sub>-H), as well as protons from hydroxyl groups (−0.013 and −0.009, respectively) attached to C<sub>5</sub> and C<sub>8</sub> carbons from naphthoquinone part indicate that the molecule of AcSh enters the  $\beta$ -CD cavity from the aromatic side. Cytotoxic activity against HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines was measured by MTT test and clonogenic assay. Mechanisms of action of free AcSh and inclusion complex were assessed by flow cytometry. In comparison to free AcSh, AcSh/ $\beta$ -CD showed stronger short-term effect on HCT-116 cells and superior long-term effect on both cell lines. Inclusion complex induced more pronounced cell cycle arrest and autophagy inhibition, and induced increase in accumulation of intracellular ROS more effectively than free AcSh. In conclusion, AcSh/ $\beta$ -CD binary system showed better performances regarding cytotoxic activity against tested tumor cell lines.

© 2019 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

As a natural naphthazarin derivative, acetylshikonin is one of the major ingredients found in red colored root extracts of the plants from family *Boraginaceae*, genera *Alkanna*, *Onosma*, *Arnebia*, *Lithospermum* and *Echium* (Papageorgiou et al., 1999; Cheng et al., 2008; Kretschmer et al., 2012; Skrzypczak et al., 2015; Vukic et al., 2017; Mirzaei et al., 2018). Acetylshikonin rich extracts have valuable usage as natural food colorants (Davis, 1988; Papageorgiou et al., 1999; Davies, 2004), while literature data have revealed that this lipophilic compound exhibits multiple pharmacological effects such as antibacterial (Papageorgiou et al., 1999; Shen et al., 2002;

\* Corresponding author at: University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia.

E-mail address: [nvukovic@kg.ac.rs](mailto:nvukovic@kg.ac.rs) (N.L. Vukovic).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.



припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>